



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM ALIMENTOS POR  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC-DAD) E  
ESPECTROFOTOMETRIA**

**SUELEN DE SOUZA MEDEIROS**

Florianópolis  
Julho/2016

**Suelen de Souza Medeiros**

**DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM ALIMENTOS POR  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC-DAD) E  
ESPECTROFOTOMETRIA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

**Orientador: Profº Dr. Gustavo Amadeu Micke**

Florianópolis  
Julho/2016

**Suelen de Souza Medeiros**

**DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM ALIMENTOS POR  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UHPLC-DAD) E  
ESPECTROFOTOMETRIA**

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize  
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Prof. Gustavo Amadeu Micke  
Orientador

---

Prof. Dra. Tatiane de Andrade Maranhão

---

Prof. Luciano Vitali

Florianópolis  
Julho/2016

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por toda a energia positiva que Ele me dá, não me deixando desanimar em cada obstáculo encontrado até aqui.

A minha família, por toda a força que me deram e por entenderem cada vez que não estive presente por algum motivo dessa longa caminhada de graduação. Em especial à minha mãe que Deus escolheu, Rejane, pelas inúmeras vezes que me desesperei e ela com carinho me acalmou, e à minha madrinha e mãe de coração por toda a força e amizade que me dá desde o dia em que nasci. Vocês duas são muito especiais na minha vida. Por todo carinho, ajuda e amor, obrigada família! Vocês são parte disso tudo!

Ao meu amor, Douglas, por toda a paciência, carinho e segurança. Seu otimismo, bondade, força e alegria foram meus alicerces nesses últimos meses. Obrigado por estar ao meu lado de coração aberto, me apoiando e incentivando.

Aos amigos que a ufsc me trouxe. Alguns que caminharam comigo desde o início, outros que encontrei no meio do caminho, a minha vida na universidade não teria sido a mesma sem vocês, com certeza. A Renata Braz, pela mãezona que ganhei, morando junto ou não. Ao Thalís, ganhei um irmão. A Julia, pela amizade e paciência me ajudando em vésperas de prova ou na vida. A Renata Menger pela sua amizade, do seu jeito calmo e carinhoso. Ao Anderson pela amizade desde antes da faculdade. A Victória pela amizade que mesmo com alguns obstáculos não deixou abater, e agora continua ainda mais forte. A Nanex pela parceria e amor do seu jeito único, que sempre me proporcionam ótimas lembranças. Em especial aos que me acompanharam de perto esses últimos dias de graduação, aguentando e acalmando os meus desesperos: Nanex, Victória e Renatas, amo todas! Toda essa caminhada foi mais feliz, por causa de vocês!

Aos amigos do LabEC, Samantha, Liza, Maira, Alysson e Fran, por todo o aprendizado e amizade. Um agradecimento especial ao Diogo, por todas as vezes que me socorreu e por toda paciência que teve comigo na elaboração deste trabalho.

Ao meu professor e orientador, Gustavo Micke, por toda dedicação, por todo o conhecimento comigo compartilhado e pela confiança na elaboração deste projeto.

*“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de  
procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso  
é consequência.”*

ALBERT EINSTEIN

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 Fotossíntese .....	13
2.2 Efeitos da Luz .....	15
2.3 Pigmentos Fotossintéticos.....	16
2.3.1 Clorofila.....	18
2.3.2 Carotenóides .....	20
2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	22
2.4.1 Instrumentação.....	22
2.4.2 Modos de detecção .....	23
2.4.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência .....	24
2.5 Espectrofotometria no UV-VIS .....	25
2.5.1 Instrumentação.....	25
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo Geral .....	27
3.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>28</b>
4.1 Materiais e reagentes .....	28
4.1.1 Preparo de padrões analíticos por cromatografia de coluna aberta.....	28
4.2.1 Preparo das soluções padrão e curva de calibração.....	29
4.2 Preparo das amostras .....	30

4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	30
4.3.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência .....	31
4.4.2 Espectrofotometria .....	31
4.5 Validação de métodos analíticos cromatográficos .....	32
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	 33
5.1 Obtenção dos padrões analíticos por cromatografia em coluna ....	33
5.1.1 Lei de Lambert-Beer.....	36
5.2 Desenvolvimento do método por UPLC .....	37
5.2.1 Otimizações cromatográficas de HPLC para UPLC .....	37
5.2.2 Avaliação do desempenho do método (quantitativo) .....	40
5.2.3 Aplicação .....	41
5.2.4 Determinação dos pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis.....	43
5.2 Desenvolvimento do método por espectrofotometria.....	44
5.3 Comparação dos resultados obtidos por cada metodologia empregada.....	45
 6 CONCLUSÃO .....	 47
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 48
 8 ANEXOS .....	 53

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Representação esquemática do processo de fotossíntese

**Figura 2.** Diagrama de um espectro eletromagnético

**Figura 3.** Estrutura química da clorofila a e clorofila b

**Figura 4.** Estrutura química de carotenoides: carotenos (a) e xantofilas (b)

**Figura 5.** Instrumentação básica de cromatografia líquida de alta eficiência

**Figura 6.** Representação esquemática de um detector com arranjo de diodos

**Figura 7.** Representação esquemática de um espectrofotômetro (feixe simples)

**Figura 8.** Cromatografia em camada delgada

**Figura 9.** Cromatografia em coluna aberta de extrato de espinafre

**Figura 10.** Cromatogramas dos pigmentos fotossintéticos isolados por cromatografia em coluna aberta com o espectro de absorção de cada analito

**Figura 11.** Cromatogramas dos pigmentos fotossintéticos isolados por cromatografia em coluna aberta com o espectro de absorção de cada analito

**Figura 12.** Cromatograma obtido nas condições de CHU et. al. usando HPLC.

**Figura 13.** Cromatograma obtido após otimizações feitas em condições UPLC

**Figura 14.** Cromatograma extrato de cenoura

**Figura 15.** Cromatograma extrato de espinafre

**Figura 16.** Espectros com banda de absorção na região UV-Vis dos pigmentos fotossintéticos



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Parâmetros utilizados e resultados obtidos por espectrofotometria.

**Tabela 2** - Parâmetros cromatográficos e de desempenho do método desenvolvido por HPLC-DAD e UPLC-DAD.

**Tabela 3** - Resultados obtidos das curvas de calibração dos carotenoides a partir do método cromatográfico aplicado.

**Tabela 4** - Resultados obtidos das curvas de calibração das clorofilas a partir do método cromatográfico aplicado.

**Tabela 5** - Comparação da concentração encontra entre as técnicas nas amostras.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, *do inglês High Performance Liquid Chromatography*

**UPLC** – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, *do inglês Ultra Performance Liquid Chromatography*

**DAD** – Detector por Arranjo de Diodos, *do inglês Diode Array Detector*

**UV** – Ultravioleta, *do inglês ultravioleta*

**ACN** – Acetonitrila, *do inglês Acetonitrile*

**AcOEt** – Acetato de etila, *do inglês Ethyl acetate*

**MeOH** – Metanol, *do inglês Methanol*

## RESUMO

A fotossíntese é um processo biológico realizado pelas plantas através da energia da luz solar, dióxido de carbono e água. A luz solar precisa ser absorvida, e as moléculas responsáveis por esta absorção são chamadas de pigmentos fotossintéticos. Dentre os mais importantes estão as clorofilas e os carotenoides, que desempenham um papel importante, tanto na natureza quanto na indústria. A concentração do pigmento em várias matrizes de amostras pode ser determinada por espectrofotometria, método simples de identificar pigmentos principais presentes numa mistura, e por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), que vem ganhando espaço em decorrência das suas vantagens quando comparada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por possuir inúmeras vantagens. Esse trabalho propôs metodologia para determinação dos pigmentos presentes em amostra de cenoura e espinafre por UPLC-DAD e espectrofotometria de absorção molecular. A metodologia UPLC foi realizada utilizando coluna C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1.8  $\mu\text{m}$ ), com fase móvel composta por acetonitrila/água com 0,1% Trietanolamina e acetato de etila em modo gradiente, monitorado em 445 nm, com volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$  e fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Na análise por UPLC, em amostra de cenoura obteve-se  $0,14 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  para luteína e  $8,26 \pm 0,31 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\beta$ -caroteno, totalizando  $8,40 \pm 0,39 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais. Em amostra de espinafre obteve-se  $6,65 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  para luteína,  $5,58 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\beta$ -caroteno, totalizando  $12,23 \pm 0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais. Para as clorofilas *a* e *b*, obteve-se  $58,88 \pm 0,76 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $23,27 \pm 0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Na análise por espectrofotometria, utilizando cubeta de 1 cm e leituras realizadas nos comprimentos de onda de 470 nm; 644,8 nm e 661,6 foi encontrado para cenoura  $6,74 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais, e para a amostra de espinafre  $53,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  de clorofila *a*,  $17,58 \mu\text{g mL}^{-1}$  de clorofila *b* e  $14,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais. A avaliação das concentrações obtidas em cada metodologia e os parâmetros de análise foram comparados.

*Palavras-chave: Pigmentos fotossintéticos, UPLC-DAD, espectrofotometria UV-Vis.*

## 1 INTRODUÇÃO

Há um fornecimento constante de energia que é preciso para a manutenção da vida no planeta. A diferença fundamental entre plantas e animais é a forma de obtê-la. Os animais adquirem matéria orgânica através da alimentação e energia química através da respiração. Já as plantas, utilizam a luz solar que incide sobre os pigmentos fotossintéticos, capturando essa energia luminosa e a convertendo em energia química, calor e fluorescência. Esse processo é chamado de fotossíntese, um dos mais importantes para a manutenção da vida no planeta.

Os pigmentos fotossintéticos são essenciais para o desenvolvimento das plantas, pois são responsáveis pela captura da energia solar incidente usada na fotossíntese, sendo assim capazes de absorver a luz visível. Dentre esses pigmentos. Os pigmentos diferem quanto à faixa do espectro da luz visível, na qual cada uma absorve luz com mais eficiência, e o seu perfil de absorção de luz é chamado de espectro de absorção.

O termo “pigmento” significa substância colorida, e a cor do pigmento fotossintetizante depende das faixas do espectro da luz visível que ele absorve, assim refletindo sua cor complementar, que é vista a olho nu. Estes pigmentos fotossintéticos podem ser as clorofilas *a*, *b* ou *c*, carotenos ou xantofilas e possuem grande importância, seja na natureza (na fotossíntese), na agricultura e consequentemente na alimentação. Como mostram diversas pesquisas, o poder antioxidante de alguns pigmentos é utilizado na prevenção de diversas doenças e também como corantes alimentares naturais, substituintes dos corantes sintéticos, que possuem maior potencial alergênico e cancerígeno.

Dessa forma, esse trabalho teve como intenção a caracterização e a quantificação dos pigmentos fotossintéticos clorofila e carotenoides, encontrados em cenoura e espinafre, através de técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos (UPLC-DAD). E também pela técnica de espectrofotometria no ultravioleta-visível.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fotossíntese

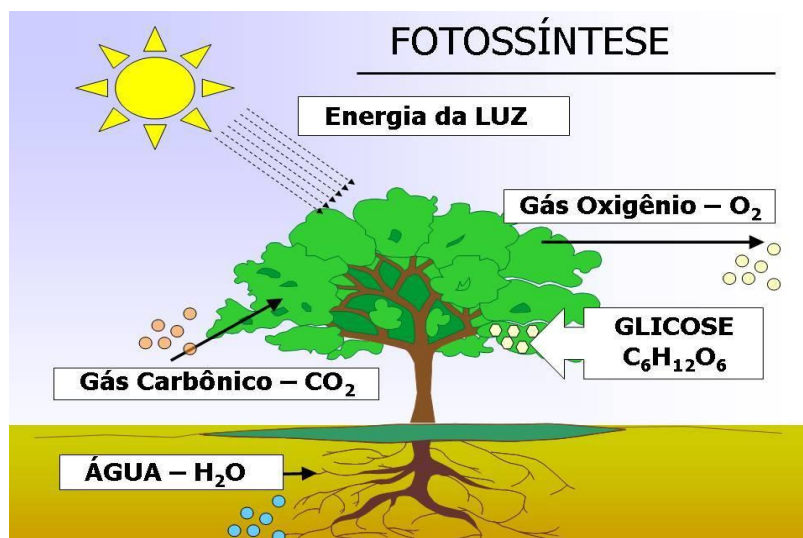
Há cerca de 300 anos atrás, diversos pesquisadores especulavam a construção da noção do que realmente seria o processo da fotossíntese. Naturalistas acreditavam que assim como os animais, as plantas extraíam seu alimento do ambiente externo, sendo que esta fonte de nutrientes seria o solo, já outros estudiosos, a partir de suas pesquisas afirmavam que a matéria da planta não provinha do solo, e sim da água.<sup>1</sup>

Um dos temas que revolucionou o estudo da química foi a combustão, sendo o estudo da fisiologia vegetal um papel relevante nas pesquisas então desenvolvidas a partir deste. Nos anos subsequentes, pesquisas diferentes se complementavam, até que Lavoisier e Laplace formularam a noção de fotossíntese em bases modernas, onde este processo não envolvesse simplesmente a troca de gases, mas sim de uma transformação química que se assemelha a uma combustão, confirmado através de experimentos com a ajuda de Laplace. Mas várias pesquisas posteriores ampliaram a compreensão do processo, até que em 1941, as especulações do pesquisador C. B. Van Niel foram confirmadas, constatando-se com evidências experimentais de que todo o oxigênio produzido durante a fotossíntese provém da água.<sup>1</sup>

O termo fotossíntese significa literalmente, “síntese usando a luz”, e consiste em dois processos acoplados. O primeiro estágio é de caráter fotoquímico, que compreende a absorção de luz e o transporte de elétrons; o outro é bioquímico, com a captação do gás carbônico e formação de compostos que encadeiam os átomos de carbono e retêm a energia absorvida a partir da luz solar nas ligações químicas das moléculas formadas.<sup>2</sup>

Para que a energia da luz possa ser utilizada na fotossíntese, ela precisa primeiramente ser absorvida. Moléculas responsáveis por esta absorção são chamadas de pigmentos fotossintéticos.<sup>3</sup> O processo básico da fotossíntese pode ser representada na Figura 1.<sup>4</sup>

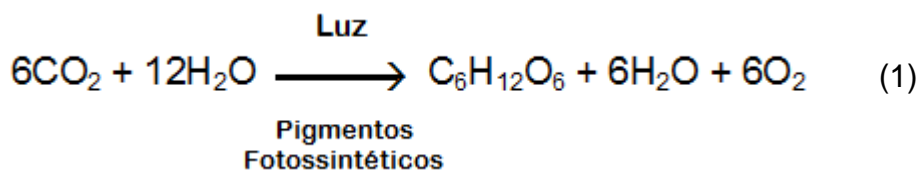
**Figura 1:** Representação esquemática do processo de fotossíntese



**Fonte:** Estudo prático<sup>4</sup>

São os pigmentos fotossintéticos que captam e utilizam a energia solar para oxidar a água, liberar oxigênio e reduzir o gás carbônico, produzindo compostos orgânicos, sendo estes primeiramente açúcares. Assim, três fatores são essencialmente básicos para a realização da fotossíntese, a energia solar, o dióxido de carbono e a água.<sup>5</sup>

Segundo a reação química (Eq. 1), há a formação da glicose, e esta, somente é possível devido à transformação da energia solar em energia química, sendo utilizada pela planta na realização de suas funções metabólicas, ou seja, é o seu principal combustível, possibilitando suas funções vitais. Sem a fotossíntese, não existiria vida em nosso planeta, pois é através dela que se inicia toda a cadeia alimentar. Daí a grande importância das plantas, vegetais verdes e alguns outros organismos. Além disso, à medida que a planta produz glicose ela elimina oxigênio, qual também é muito importante para a manutenção da vida no planeta.<sup>6</sup>



É estimado que 40% da massa seca de uma planta consistem em carbono fixado no processo da fotossíntese.<sup>7</sup> Ainda que a eficiência dessa transformação em

biomassa através da fotossíntese seja de aproximadamente 6%, este constitui um dos mecanismos mais eficientes de produção de energia do planeta.<sup>8</sup>

## 2.2 Efeitos da Luz

A luz, fonte primária de energia na fotossíntese, é parte da radiação eletromagnética que é visível ao olho humano. A fotometria é o ramo da óptica que se preocupa em medir a luz, em termos de como seu brilho é percebido pelo olho humano. Os métodos fotométricos usam a luz que possui características de uma partícula (fóton) e de uma onda eletromagnética, para medir algo (métrico), que é geralmente a concentração de um cromóforo, isto é, um composto que tem capacidade de interagir com a luz, devido a sistemas conjugados que são gerados a partir de séries de ligações duplas e simples alternadas, ou complexos metálicos que surgem da divisão de orbitais “d” ao vincular metais de transição com ligantes.<sup>9</sup>

As plantas utilizam-se dessa radiação fotossinteticamente ativa, a chamada luz visível, com comprimentos de onda que vão do violeta, com cerca de 400 nm, ao vermelho, com 700 nm. Cada molécula de clorofila pode absorver apenas um *quantum* de energia de cada vez, o que causa excitação de um determinado elétron de um dos átomos da molécula. Os elétrons que estão em orbitais no estado estável do átomo recebem a energia e podem se deslocar para orbitais mais distantes do núcleo, a uma distância que é proporcional à energia de um fóton que absorveu. A molécula do pigmento encontra-se, então, no estado excitado, e é esta energia de excitação que é usada na fotossíntese. As clorofilas e outros pigmentos permanecem no estado excitado por períodos muito curtos, de aproximadamente 1 (um) bilionésimo de segundo ( $10^{-9}$ ) e a energia é perdida por calor ou por fluorescência.<sup>10</sup>

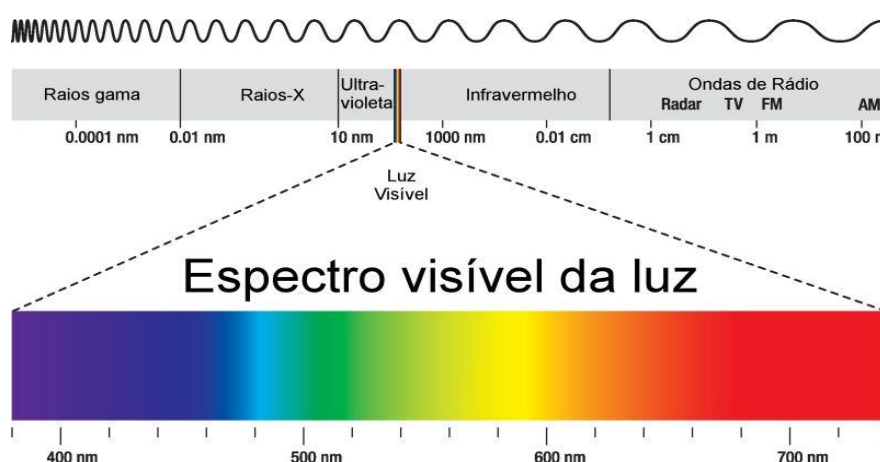
Todos os pigmentos fotossintéticos absorvem seletivamente certos comprimentos de onda de luz. A luz que é absorvida pode ser usada pela planta para promover reações químicas, deixando transmitir aos olhos humanos apenas aqueles comprimentos de onda não absorvido. A energia absorvida pelos pigmentos é transferida para sítios bem definidos, localizados sobre as membranas tilacóides, os chamados centros de reação.<sup>11</sup>

O espectro eletromagnético cobre uma ampla faixa de energias, e referentes comprimentos de onda. As “cores” da luz (comprimentos de onda) não possuem a

mesma energia, pois o nível energético de um fóton é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda. Essas regiões espectrais incluem os raios  $\gamma$  (gama), os raios X, ultravioleta (UV), visível, infravermelho (IV), micro-ondas e radiofrequência (RF), como pode ser observado na figura 2.<sup>12</sup> O equipamento mais utilizado no método fotométrico é o espectrofotômetro, projetado para a medida da absorção de radiação no ultravioleta, visível ou no infravermelho, na qual emprega um filtro para seleção do comprimento de onda juntamente com um transdutor de radiação adequado, gerando um espectro de absorção. A cor é relacionada com os diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético.<sup>13</sup>

A concentração do pigmento em várias matrizes de amostras pode ser determinada pelo método espectrofotométrico, que é um método clássico e, ao mesmo tempo, a maneira mais simples de identificar pigmentos principais presentes numa mistura.<sup>14</sup>

**Figura 2.** Diagrama de um espectro eletromagnético



**Fonte:** HALLIDAY e RESNICK (2009)

### 2.3 Pigmentos Fotossintéticos

Pigmentos fotossintéticos são também chamados de fotorreceptores, pois absorvem a luz solar para eventual uso em processo fisiológico. Dentre os mais importantes pigmentos presentes nos vegetais, estão as clorofilas e os carotenoides. A maioria das células fotossintetizantes contém dois tipos de clorofila, e um deles sempre é a clorofila *a*, que é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica, o primeiro estágio do processo fotossintético. O segundo tipo de clorofila geralmente é



a clorofila *b*, encontrada nos vegetais superiores, ou a clorofila *c* encontradas em muitas algas, auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios, como os carotenóides.<sup>3</sup>

O termo pigmento significa substância colorida e a cor refletida de cada pigmento depende da região do espectro da luz visível em que ele absorve. Conforme o pigmento, diferente é a faixa espectral absorvida, dependendo da sua eficiência para captar a luz (sol) para assim desencadear o processo fotossintético. A clorofila tem absorção máxima na faixa do azul e vermelho, onde está o espectro de ação para a fotossíntese, refletindo a olho nu a luz verde.<sup>9</sup> Do mesmo modo, os carotenóides (carotenos e xantofilas), absorvem na faixa do azul e violeta, sendo geralmente vermelhos, laranjas e amarelos.<sup>15</sup>

O estudo destes pigmentos tem auxiliado no desenvolvimento de tecnologias para maximizar a produtividade agrícola e possibilitar o zoneamento agroclimático de muitas culturas, podendo ser utilizados como parâmetros indicativos de estresse nas plantas.<sup>16</sup>

Estes desempenham um papel importante, tanto em natureza quanto na indústria e são amplamente utilizados como aditivos ou suplementos na indústria de cosméticos, produtos farmacêuticos, corantes naturais e principalmente nos alimentos, devido suas diferentes colorações, uma propriedade de grande importância tecnológica uma vez que a cor é o atributo que mais influencia a aceitação dos alimentos.<sup>17</sup> Os pigmentos fotossintéticos não podem ser sintetizados por tecidos animais, mas possuem muitas funções importantes no organismo, como antioxidantes ou suplementos vitamínicos, entre outros. Por essa importância, que as opções naturais começam a ganhar mais mercado a fim de substituir os corantes sintéticos para alimentos.<sup>14,18</sup>

Para estimar o potencial fotossintético das plantas, teores de clorofila e carotenóides nas folhas são utilizados pela sua ligação direta à absorção e transferência de energia luminosa e ao crescimento e adaptação a diversos ambientes.<sup>19</sup> A determinação do conteúdo de clorofila é comumente utilizada na pesquisa com plantas, e para isso, técnicas que necessitam de procedimentos de preparo de amostras envolvendo a destruição das mesmas são tradicionalmente utilizadas. Entre essas, três métodos são os mais utilizados para quantificação dos pigmentos, sendo estes a espectrofotometria, a fluorimetria e cromatografia líquida

de alta eficiência. O método por HPLC é o mais preciso, mas não é o mais adequado para análises de rotina de clorofila.<sup>20</sup> Em geral, os métodos destrutivos utilizam vários protocolos de laboratório com elevado consumo de reagentes químicos, tornando-os caros além de trabalhosos.<sup>21</sup>

Equipamentos portáteis baseados em sensores ópticos para estimar o conteúdo de clorofila nas folhas das plantas, foram desenvolvidos na década de 90, utilizando as características de refletância da clorofila. Esses dispositivos, também chamados de clorofilômetros, determinam com rapidez o conteúdo de clorofila nas folhas e permitem estimar o estado nutricional de uma cultura para aplicações eficientes de fertilizantes nitrogenados.<sup>22</sup> A análise do teor de clorofila é utilizada para avaliar o efeito das condições nutricionais do solo, encontrada correlação positiva entre teor de nutrientes e aumento da concentração dos pigmentos.<sup>23</sup>

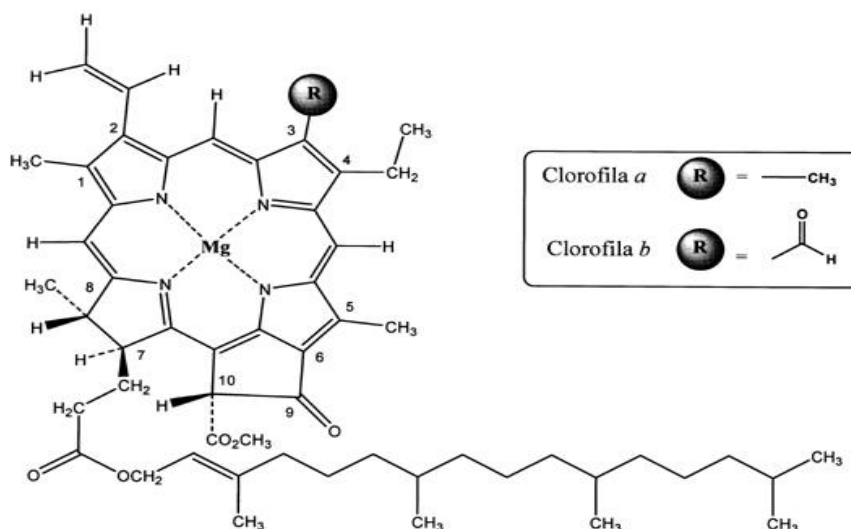
### **2.3.1 Clorofila**

Os pigmentos fotossintéticos presentes e sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila é a designação de um grupo de pigmentos fotossintéticos naturais presente nas plantas e em outros tecidos vegetais e está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. Em 1818, Pelletier e Caventou propuseram o nome clorofila derivado das palavras gregas que significam verdes (chloros) e folha (phyllon).<sup>5</sup>

A intensa coloração verde desse pigmento deve-se a suas fortes absorções das regiões azuis e vermelhas do espectro eletromagnético, e por conta dessas absorções a luz refletida e transmitida dá-se na sua cor complementar verde.<sup>24</sup> São moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio. Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica insaturada constituída por quatro anéis de pirrol. Esses anéis numeram-se de 1 a 4 ou de “a” a “d”, de acordo com o sistema de numeração de Fisher. A clorofila presente nas plantas verdes pode ser de duas formas, *a* e *b*, enquanto as clorofilas *c* e *d* são encontradas especialmente em algas e cianobactérias. As clorofilas *a* e *b* são encontradas quase sempre em conjunto, sendo a clorofila *a* mais abundante na maioria dos casos, numa proporção de 3:1 em relação à clorofila *b*.<sup>14</sup>

A clorofila *a* e *b* diferem nos substituintes de carbono C-3 (Figura 3).<sup>25</sup> Na clorofila *a* o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) no C-3 e a clorofila *b* contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil (-CH<sub>3</sub>).<sup>24</sup>

**Figura 3.** Estrutura química da clorofila *a* e clorofila *b*.



**Fonte:** STREIT *et al.* (2005)

As clorofilas se localizam nos cloroplastos, onde a luz é capturada e se inicia o processo fotossintético, que é dividido em duas importantes reações, sendo uma fotoquímica ou fase luminosa, que ocorre nas membranas dos tilacóides da planta, e a outra bioquímica ou fase escura, no estroma do cloroplasto. Esta organela contém também os chamados pigmentos acessórios, como os carotenoides, além das clorofilas.<sup>24,26</sup>

De acordo com Hartmut K. Lichtenthaler<sup>27</sup>, os dois principais máximos de absorção na região do vermelho e do azul de ambas as clorofilas (*a* e *b*) tem seus comprimentos de onda deslocados com o aumento da polaridade do solvente extrator. Quanto maior a polaridade do solvente, maior o comprimento de onda.

Além de ser empregada em várias composições farmacêuticas, como cosméticos, material de higiene bucal, em dietas, culinária e até mesmo em alguns detergentes, este pigmento têm sido apontado como excelente fotossensibilizador, antioxidante e como agente terapêutico no combate de diversas doenças.<sup>28</sup> Pesquisas recentes com derivados da clorofila tem relatado serem muito

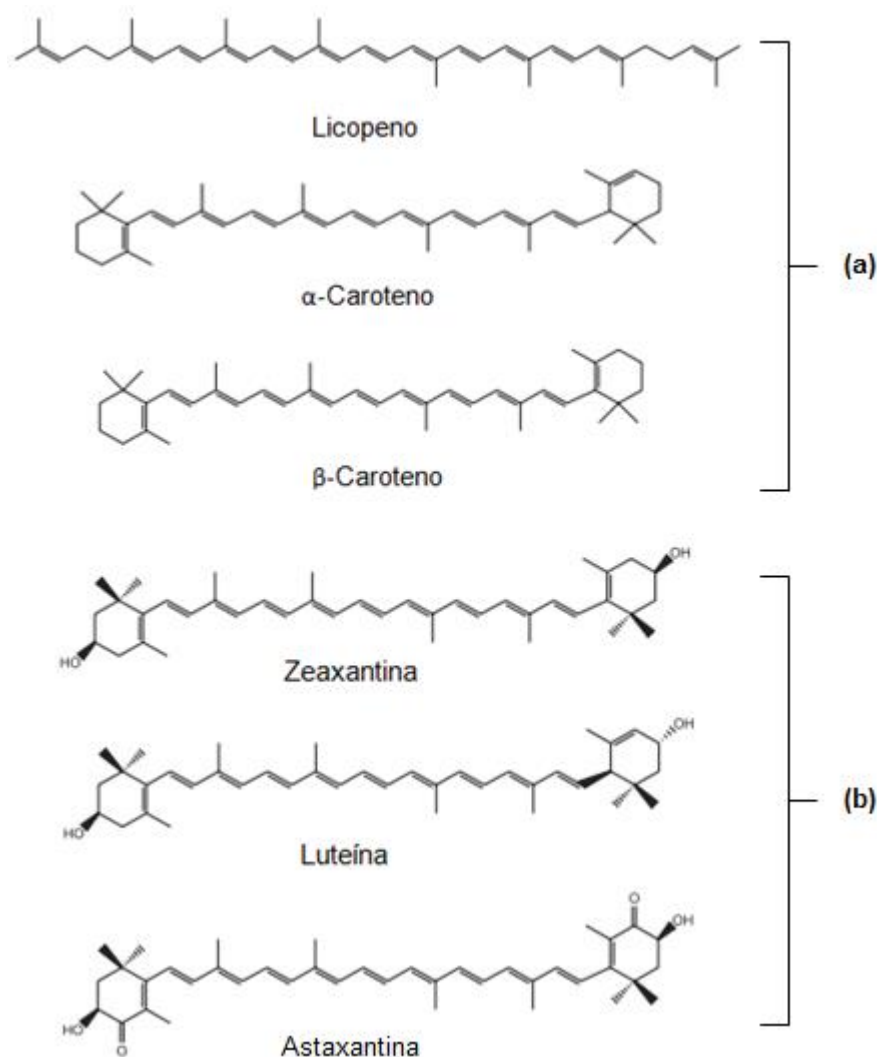
eficazes como fotossensibilizadores naturais contra larvas de várias espécies de insetos, auxiliando no controle e eliminação da dengue.<sup>29</sup>

### **2.3.2 Carotenóides**

Os carotenóides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais devido à larga distribuição, diversidade estrutural e inúmeras funções. São corantes naturais, responsáveis pelas cores laranja, amarela e vermelha das frutas, hortaliças e plantas em geral.<sup>30</sup> Geralmente, são tetraterpenóides com 40 átomos de carbono e se classificam em dois grupos básicos: carotenóides hidrocarbonados, denominados carotenos, e carotenóides oxigenados, denominadas xantofilas. Atualmente, já foram identificados mais de 600 tipos de carotenóides, classificados por diferentes estruturas e distribuídos em várias formas isoméricas.<sup>31</sup>

Sua característica mais acentuada é a cadeia longa com sistemas de duplas ligações conjugadas, conhecido como grupamento cromóforo, responsável pela absorção de luz (Figura 4). Essas duplas ligações, podem ocorrer na forma *cis* ou *trans*. Os compostos com todas as ligações na forma *trans* apresentam uma cor mais escura, conseqüentemente, o aumento de ligações *cis* resulta em um enfraquecimento gradual da cor, perdendo também sua atividade pró-vitamínica.<sup>32</sup>

**Figura 4.** Estrutura química de carotenóides: carotenos (a) e xantofilas (b).



**Fonte:** VALDUGA *et al.* (2009)

Os carotenoides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas. Devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos.

Tem sido dedicada, nos últimos anos, uma crescente atenção aos carotenoides no papel da dieta na saúde humana. Como não são produzidos de forma natural pelos animais, há grande procura por alimentos ricos destes pigmentos. Nos tecidos de plantas comestíveis como em animais, entre os pigmentos mais comuns estão o licopeno,  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina, e a astaxantina, encontrados no tomate, cenoura, milho e camarão, respectivamente.<sup>33</sup>

Além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitâmica A e as propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde, destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, catarata e doenças cardiovasculares.<sup>34</sup>

As condições ambientais como luminosidade, agitação, pH vem sendo examinados com atenção, há algumas décadas, a fim de avaliar os microrganismos produtores de pigmento (microalgas, fungos e bactérias), pois a composição do meio de cultivo na agricultura, tais como a fonte de carbono e nitrogênio, presença de metais, sais e agentes químicos é um fator que necessita de investigação para um aumento e melhora na produção de carotenoides.<sup>32</sup>

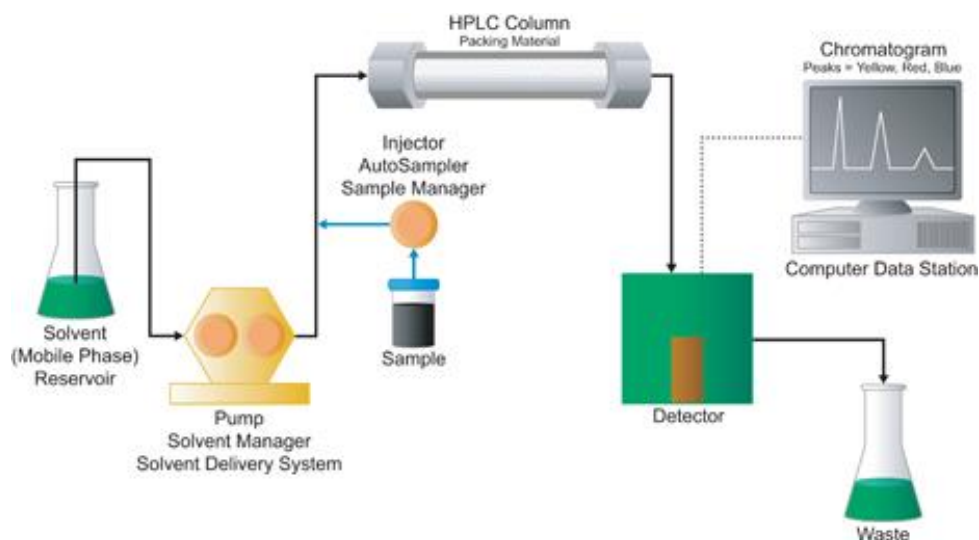
## **2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência**

A técnica de separação que foi utilizada nesse trabalho é conhecida como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês, High Performance Liquid Chromatography), que se tornou indispensável como ferramenta analítica em muitos laboratórios. É a técnica mais empregada de cromatografia por eluição e é utilizada para a separação de uma grande variedade de espécies químicas, que variam desde materiais orgânicos e inorgânicos e se estendendo aos biológicos. Ela é baseada na interação do analito com uma fase estacionária finamente dividida no interior de uma coluna e uma fase móvel líquida sob alta pressão. Existem diversos tipos de mecanismos de separação cromatográfica, tais como a de partição, adsorção, troca iônica, exclusão, afinidade ou cromatografia quiral.<sup>35</sup>

### **2.4.1 Instrumentação**

A instrumentação necessária na técnica de HPLC é simples, contendo uma bomba de alta pressão, um sistema de distribuição de solventes, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para o controle do sistema e análise dos dados (Figura 5), sendo que alguns aparelhos contém um forno para controle da temperatura da coluna cromatográfica.<sup>35,36</sup>

**Figura 5.** Instrumentação básica da cromatografia líquida de alta eficiência



**Fonte:** *Chemical instrumentation\**

\*Disponível em: <http://chemicalinstrumentation.weebly.com/hplc.html>. Acesso em maio de 2016.

Os solventes devem ser de alto grau de pureza e com mínima quantidade de gases dissolvidos. Há dois modos de eluição em cromatografia líquida: a eluição isocrática e a eluição por gradiente. A eluição isocrática é aquela que um único solvente ou uma mistura de solventes é mantido constante durante a análise, já a eluição com gradiente é aquela na qual ocorre a variação de quantidades de solventes orgânicos durante a corrida cromatográfica.<sup>35,36</sup>

O principal componente é a coluna, na qual ocorre a partição do analito com a fase estacionária presente em seu interior, na qual pode ser polar ou apolar, dependendo da constituição do material que é feita a fase estacionária.<sup>35,36</sup>

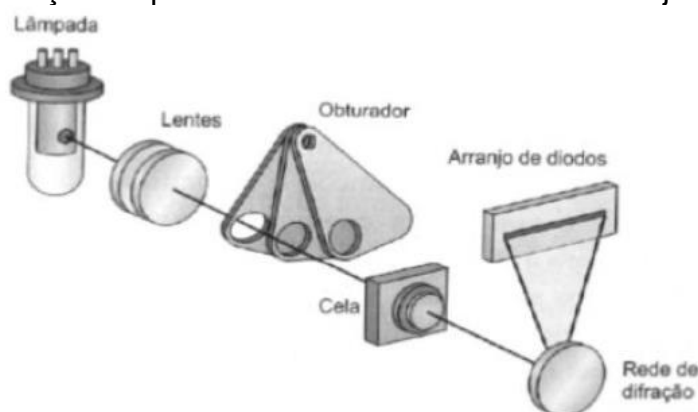
#### **2.4.2 Modos de detecção**

Existe uma grande variedade de detectores disponíveis para os instrumentos de cromatografia líquida de alta eficiência. A escolha do melhor detector depende do tipo de analito que está sendo analisado no instrumento. Alguns exemplos são os de ultravioleta, índice de refração, eletroquímico, fluorescência, condutividade, espectrometria de massas.<sup>35,36</sup>

Um dos detectores mais amplamente empregados na cromatografia líquida é aquele baseado na absorção de radiação ultravioleta ou visível, sendo os detectores com um conjunto de fotodiodos (DAD) os mais modernos, sendo capazes de registrar o espectro inteiro de cada analito assim que ele é eluído da coluna.<sup>35,36</sup>

Esse tipo de detector possui em sua constituição um conjunto de lâmpadas de deutério e de tungstênio que emitem radiação na região do UV-visível<sup>35</sup>, contribuindo com uma grande exatidão e precisão nas medidas de comprimento de onda, alta resolução e sensibilidade e um nível de sinal/ruído baixíssimo. Oferece também um espectro para cada tempo de retenção, permitindo a verificação da pureza do pico cromatográfico e da eficiência da separação.<sup>37</sup> A Figura 6 apresenta de maneira esquemática como funciona esse detector.<sup>38</sup>

**Figura 6.** Representação esquemática de um detector com arranjo de diodos.



**Fonte:** LANÇAS (2009)

### **2.4.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência**

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês Ultra Performance Liquid Chromatography) vem ganhando espaço em todas as áreas de aplicação da cromatografia líquida em decorrência das suas vantagens comparada à convencional HPLC. Com os mesmos princípios de separação da HPLC, esta técnica possui inúmeras vantagens permitindo análises mais rápidas e mais eficientes.<sup>39</sup>

A partir de novas fases estacionárias e suportes cromatográficos, esta técnica tem sido alvo de novas pesquisas. Com colunas de dimensões reduzidas e recheadas com partículas menores de 2  $\mu\text{m}$  geram um aumento significativo na



pressão cromatográfica, porém dentre suas melhorias estão o aumento da detectabilidade e sensibilidade, melhor resolução, com picos mais estreitos e menor tempo de retenção.<sup>39</sup>

Em decorrência dessas vantagens, a técnica de UPLC tem sido bastante importante na “química verde”, pelo reduzido gasto de fase móvel, e assim, menor geração de resíduos.<sup>39</sup>

## 2.5 Espectrofotometria no UV-VIS

Espectroscopia é o estudo da interação entre matéria e radiação eletromagnética. A luz ultravioleta e a luz visível fornecem energia permitindo transições eletrônicas, promoção de um elétron de um orbital de menor energia ou estado fundamental para um orbital de maior energia, seu estado excitado. Dependendo da energia necessária para a transição eletrônica, a molécula pode absorver na região do ultravioleta ou no visível.<sup>40</sup>

A técnica é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que propõe que em um determinado comprimento de onda, a absorvância depende da concentração de espécies absorventes no meio em que a luz atravessa (Eq. 2).

$$A = \epsilon bc \quad (2)$$

Onde A é a absorvância,  $\epsilon$  é a absortividade molar, b é o caminho ótico e C é a concentração da espécie absorvente.

Por apresentar boa robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações, a espectrofotometria na região do ultravioleta e do visível (UV-VIS) é uma ferramenta analítica consolidada, sendo uma das técnicas analíticas mais empregadas.<sup>41</sup>

### 2.5.1 Instrumentação

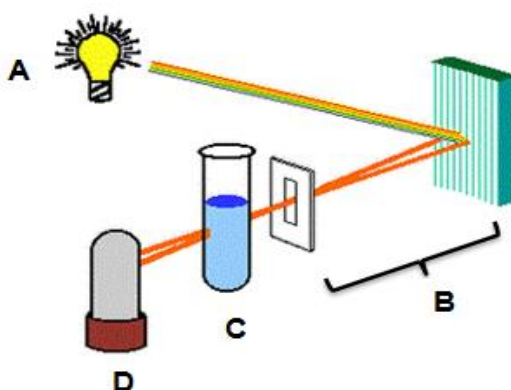
Os espectrofotômetros podem ser de feixe simples ou de feixe duplo onde um feixe de luz passa por um divisor de feixe o qual alternadamente direciona este para a amostra ou para a cela de referência várias vezes por segundo. Neste trabalho será utilizado o equipamento de feixe simples.

O espectrofotômetro de feixe simples (Figura 7) primeiramente registra o espectro da referência e em seguida o da amostra. Este consiste basicamente de uma fonte luz (A), onde normalmente usa-se lâmpada de deutério e tungstênio, sendo a primeira para a região do UV e a segunda para a região do visível.

Outra parte de um espectrofotômetro é o monocromador (B). São destinados a selecionar faixas do espectro de emissão de luz. Os monocromadores podem ser de prismas, de grade, como da Figura 7, ou de filtro. Após passar pelos monocromadores o feixe de luz incide na amostra que está em uma célula (C). As células normalmente são de quartzo ou vidro, porém a de vidro só pode ser utilizada para análises na região do visível, pois absorve na região do UV.

Por último, o detector (D). Os espectrofotômetros podem empregar um ou vários detectores. Os que empregam apenas um detector são chamados monocanais ou temporais e monitoram de forma sequencial as intensidades de radiação do espectro eletromagnético. Aqueles que empregam vários detectores são chamados multicanais ou espaciais, monitorando simultaneamente vários comprimentos de onda. Esses equipamentos também podem ser dispersivos, empregando, via de regra, uma rede de difração, e não-dispersivos, empregando, por exemplo, filtros ou diodos emissores de luz.<sup>37</sup>

**Figura 7.** Representação esquemática de um espectrofotômetro (feixe simples)



**Fonte:** *Chemical Instrumentation\**

\*Disponível em: <http://chemicalinstrumentation.weebly.com/uv-spectrometry.html>.

Acesso em maio de 2016

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O principal objetivo do trabalho consiste na determinação de pigmentos fotossintéticos em alimentos utilizando a espectrofotometria e a cromatografia líquida de alta e ultra eficiência com detector de arranjo de diodos, como técnica de separação e detecção dos compostos de interesse.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Preparar padrões analíticos de pigmentos fotossintéticos por cromatografia em coluna;
- Otimizar a separação e detecção dos compostos em HPLC-DAD para UPLC-DAD;
- Testar metodologias para quantificação dos pigmentos usando espectrofotometria UV-Visível;
- Preparar extratos vegetais para obtenção dos pigmentos;
- Quantificar os pigmentos em diferentes matrizes vegetais.
- Comparação dos resultados obtidos pelos métodos espectrofotométrico e UPLC, a fim de avaliar características de cada método para análise dos pigmentos.

## 4. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de eletroforese capilar (LabEC) situado no departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

### 4.1 Materiais e reagentes

Durante o experimento foram utilizados tubos de ensaio e vidrarias comuns de rotina: balões volumétricos, pipetas volumétricas calibradas e aferidas. Para todas as pesagens foi utilizada balança analítica Bel Engineering com precisão 0,1 mg. Para as extrações dos pigmentos, foi utilizado acetona e clorofórmio (ambas, Vetec), para filtração sulfato de sódio anidro (Synth) e butil hidroxi tolueno (Sigma-Aldrich) como antioxidante. Padrões de clorofila *a*, clorofila *b* e  $\beta$ -caroteno foram obtidos através de cromatografia em coluna aberta, com sílica gel (synth) e fase móvel composta por hexano e acetona (ambas, Synth). Padrão de luteína foi doado por Farma Service Distribuidora Ltda. Soluções padrão de estoque foram preparadas com diluente composto por ACN, MeOH e AcOEt (4:3:3, v/v/v) adquiridos da Aldrich, Vetec e Synth respectivamente, e armazenadas sob refrigeração (4 °C). Para preparo da FM foram utilizados ACN e AcOEt grau HPLC (Aldrich e Synth, respectivamente), Trietanolamina (Química Moderna) e água pura Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, United States). As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente a partir da diluição das soluções estoque com o diluente. As amostras utilizadas para aplicação da metodologia desenvolvida, cenoura e espinafre foram adquiridas em mercado local.

#### 4.1.1 *Preparo de padrões analíticos por cromatografia de coluna aberta*

Os padrões analíticos dos pigmentos fotossintéticos usados foram preparados por extração a partir de amostras de espinafre empregando cromatografia em coluna aberta. Foi realizada a partir de 100,06 g de folhas de espinafre em 150 mL de clorofórmio, por maceração seguido de agitação, por 30 minutos. Após filtração e rotaevaporação para retirada do solvente, o extrato foi ressuspenso em pequena quantidade de clorofórmio e adsorvido em sílica gel para

obtenção da pastilha contendo os pigmentos fotossintéticos de interesse para isolamento por cromatografia em coluna. A sílica gel também foi utilizada na coluna como fase estacionária. A eluição dos pigmentos de interesse foi realizada com fase móvel composta por hexano/acetona e as frações do eluato foram isoladas de acordo com as variações visuais na cor das bandas separadas e analisadas por espectrofotometria e UPLC-DAD para confirmação dos mesmos.

#### **4.2.1 Preparo das soluções padrão e curva de calibração**

##### **4.2.1.1 Luteína e $\beta$ -caroteno**

A solução analítica estoque de padrão de luteína foi preparada na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em diluente ACN/MeOH/AcOEt (4:3:3, v/v/v), efetuando-se o cálculo para determinar a quantidade de padrão a ser pesado. A solução analítica estoque do  $\beta$ -caroteno foi preparada a partir das frações do eluato recolhido da cromatografia em coluna.

As soluções analíticas estoques foram preparadas em balão volumétrico de 10 mL, sendo então transferidas para frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) e armazenadas em geladeira, por curto período, de forma a evitar a degradação dos analitos.

A partir da solução estoque foi preparada as soluções de trabalho, na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para cada padrão. As curvas de calibração foram obtidas a partir de 6 níveis de concentração, utilizando triplicatas autênticas preparadas em diluente a partir da diluição das soluções de trabalho, com a concentração determinada pela leitura da absorvância de cada solução de trabalho, pela lei de Lambert-Beer.

Os níveis de concentração para o  $\beta$ -caroteno foram 0,98; 1,97; 2,95; 4,92; 6,88 e  $9,83 \text{ mg L}^{-1}$  e para a luteína foram de 3,20; 6,40; 10,0; 16,0; 22,40 e  $32,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Após preparadas, essas soluções foram diretamente injetadas no UPLC.

##### **4.2.1.2 Clorofilas**

As soluções analíticas de trabalho das clorofilas foram preparadas a partir das frações de eluato recolhidas na coluna cromatográfica e as concentrações

determinadas pela lei de Lambert-Beer. As soluções de trabalho feitas em diluente ACN/MeOH/AcOEt (4:3:3, v/v/v), obtiveram concentrações de 11,67  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 5,10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para a clorofila *a* e clorofila *b*, respectivamente.

As curvas de calibração foram preparadas em 5 níveis de concentração, utilizando triplicatas autênticas preparadas em diluente a partir da diluição das soluções de trabalho. Os níveis de concentração para clorofila *a* foram 1,17; 2,29; 4,67; 7,00 e 11,67  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para clorofila *b* foram de 0,51; 1,02; 2,04; 3,06 e 5,10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após preparadas, essas soluções foram diretamente injetadas no HPLC.

## 4.2 Preparo das amostras

O processo de extração foi realizado com base no trabalho de CHU *et al.*,<sup>43</sup> com algumas modificações. Foram utilizadas amostras de cenoura e espinafre. As amostras foram trituradas e para extração dos pigmentos fotossintéticos, foi pesado 1 g de cada e mantido em agitação por 1 hora, em sistema fechado e protegido da luz, com 10 mL de acetona contendo 0,1% de BHT. Após agitação, o extrato foi filtrado em papel filtro contendo sulfato de sódio anidro para retirar qualquer resíduo aquoso, e então coletado 1 mL do filtrado em triplicata. Para a análise espectrofotométrica, foi adicionado 1 mL de cada extrato em balão volumétrico de 5 mL, e avolumado com acetona p.a. Para a análise cromatográfica, foi coletado 1 mL dos extratos em eppendorf, seco em nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) e ressuspendido no diluente. Os extratos foram armazenados em uma temperatura aproximada de 5-10°C e protegidos da luminosidade até análise, que foi efetuada no mesmo dia, a fim de evitar degradação dos pigmentos fotossintéticos.

## 4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1290 G1311B (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com detector DAD modelo G4212B. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (Gemini – Phenomenex, com dimensões de 150 mm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ). A degaseificação da FM foi feita por imersão do frasco contendo a solução em um equipamento de ultrassom com o bocal do frasco conectado a uma bomba de vácuo. As injeções foram realizadas no modo manual com o auxílio de

uma micro seringa, em uma alça de amostragem com capacidade volumétrica de 20  $\mu\text{L}$ .

#### **4.3.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência**

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1290 G1311B (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com detector DAD modelo G4212B. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (ZORBAX RRHD Eclipse Plus, 50 mm x 2,1 mm e tamanho da partícula de 1.8  $\mu\text{m}$ ) com limite de pressão de até 1200 bar. A degaseificação da FM foi feita por imersão do frasco contendo a solução em um equipamento de ultrassom com o bocal do frasco conectado a uma bomba de vácuo. As injeções foram realizadas no modo manual com o auxílio de uma micro seringa, em uma alça de amostragem com capacidade volumétrica de 5  $\mu\text{L}$ .

##### **4.3.1.1 Condições cromatográficas**

As análises foram realizadas em modo gradiente com fase móvel composta por 90% acetonitrila e 10% água com 0,1% de trietanolamina (Solvente A) por 2,5 minutos, em seguida, aumento para 50% acetato de etila à 100% (Solvente B), por 2,5 minutos, e mantido a 50% do solvente A e 50% do solvente B, por mais 2,5 minutos, e por fim, retorna-se as condições iniciais do gradiente destinados ao condicionamento da coluna. O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$  e o fluxo de 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . As análises foram realizadas a temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ), com monitoramento em 445 nm, e análises espectrais de 200 a 600 nm gravadas e armazenadas durante a corrida.

#### **4.4.2 Espectrofotometria**

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de absorção UV-Vis modelo HP8453 (Hewlett Packard, Alemanha) de feixe simples, com arranjo de diodos. Foram utilizadas cubetas de vidro com o caminho ótico igual a 1 cm. As amostras passaram por uma filtração, retendo as impurezas, pois como

se trata de um método colorimétrico, a transparência da amostra pode afetar nos resultados expressos. As leituras foram realizadas em 470; 644,8; 661,6 e 750 nm.

#### 4.5 Validação de métodos analíticos cromatográficos

Os parâmetros analíticos mais utilizados para avaliar métodos de separação são:

**Seletividade:** é a capacidade do método em quantificar analito na presença de interferentes existentes na mostra com exatidão<sup>44</sup>;

**Linearidade:** é a eficiência do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação<sup>44</sup>;

**Faixa aplicação:** corresponde ao intervalo entre o valor inferior e superior do analito em estudo<sup>44</sup>;

**Limite de Detecção (LOD):** é a menor concentração que pode ser detectada do analito presente na amostra<sup>45</sup>, calculado a partir da equação 3:

$$LOD = 3,3 \times \frac{S}{S} \quad 3$$

**Limite de Quantificação (LOQ):** é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada<sup>44</sup>, calculado a partir da equação 4:

$$LOQ = 10 \times \frac{S}{S} \quad 4$$

**Exatidão:** é a proximidade dos valores experimentais obtidos em relação ao valor verdadeiro. Os processos mais utilizados para analisar a exatidão de um método, são: *materiais de referência*, *adição de padrão*, *ensaio de recuperação* e *comparação de métodos*<sup>44,45</sup>;

**Precisão:** corresponde a dispersão de resultados entre ensaio repetidos, independente de uma amostra, padrões ou amostras diferentes. A precisão pode ser avaliada por meio da *repetibilidade* (várias medições da mesma amostra em diferentes preparações), *precisão intermediária* (analisar a mesma amostra no mesmo laboratório, mas com diferentes analistas ou diferentes dias ou diferentes equipamentos) e *reprodutibilidade* (avaliado por meio de um estudo inter-laboratorial através da mudança de local, equipamentos, operador e entre outros obtendo um grau de concordância entre os resultados das medições)<sup>44,45</sup>;



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção dos padrões analíticos por cromatografia em coluna

Com base no artigo publicado na *Analytical Chemistry an Indian Journal* de Sidney Pacheco *et. al.*,<sup>42</sup> a maior dificuldade em análises quantitativas por HPLC, é a obtenção de padrões analíticos. Padrões com alta pureza e certificação na maioria das vezes dependem de importações e alto custo de aquisição, como no caso dos pigmentos que possuem uma média de preço de R\$ 1500,00 para 1 mg de cada padrão verificado no site de compras da Sigma-Aldrich. E em alguns casos o padrão requerido pode não ter ainda disponibilidade comercial.

Uma alternativa que pode ser utilizada é a obtenção de padrões via cromatografia em coluna aberta. A partir desta metodologia, foram isolados três compostos para utilização como padrões analíticos, para posterior quantificação das amostras de interesse.

O  $\beta$ -caroteno é um pigmento representativo da classe dos carotenoides, e possui propriedade lipofílica. Os carotenos, formados apenas por átomos de carbono e hidrogênio, são moléculas apolares, já as xantofilas, representada pela luteína, possuem pequenos números de grupos funcionais oxigenados, tornando ligeiramente mais polar. As clorofilas também possuem cadeias hidrocarbonadas, mas devido ao seu núcleo central de porfirina contendo quatro átomos de nitrogênio coordenados ao metal magnésio, assim como os grupos éster e cetona presentes na molécula, tornam as clorofilas mais polares que os carotenoides, com a clorofila b possuindo maior polaridade em comparação à clorofila a, devido a substituição do grupo metil por um grupo aldeído. Sendo assim, com a fase móvel apolar e a fase estacionária polar, os pigmentos eluem na ordem de interação carotenoides > clorofila a > clorofila b. A técnica de cromatografia em camada delgada foi utilizada para avaliar a melhor fase móvel para separação dos pigmentos fotossintéticos eluidos da coluna aberta. A obtenção da melhor separação dos pigmentos do espinafre se dá por hexano e acetona numa proporção de 80:20, respectivamente, como pode-se observar na figura abaixo:

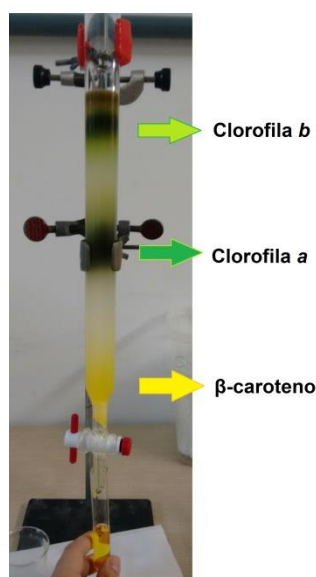
**Figura 8.** Cromatografia em camada delgada



**Fonte:** Autoria própria (2016)

A eluição da coluna foi realizada com fase móvel de hexano/acetona (80:20) e as frações do eluato foram isoladas de acordo com as variações visuais na cor das bandas separadas (Figura 9). Foram obtidas 43 frações, todas analisadas por espectrofotometria e UPLC-DAD, para confirmação dos analitos isolados. As frações de 2 a 4 continham  $\beta$ -caroteno, de 8 a 12 continham clorofila *a* e de 36 a 38 continham clorofila *b*. Esses dados foram confirmados pelo espectro de absorção de cada um, comparados a literatura.

**Figura 9.** Cromatografia em coluna aberta de extrato de espinafre

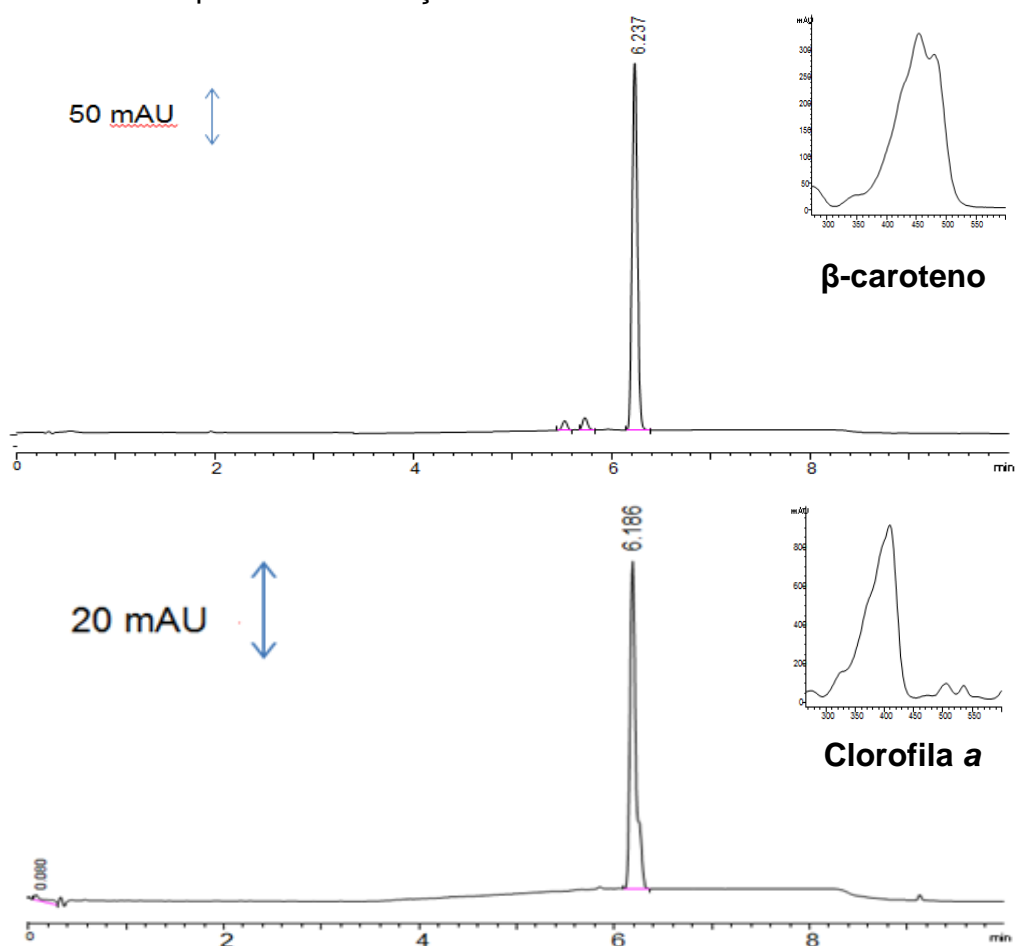


**Fonte:** Autoria própria (2016)

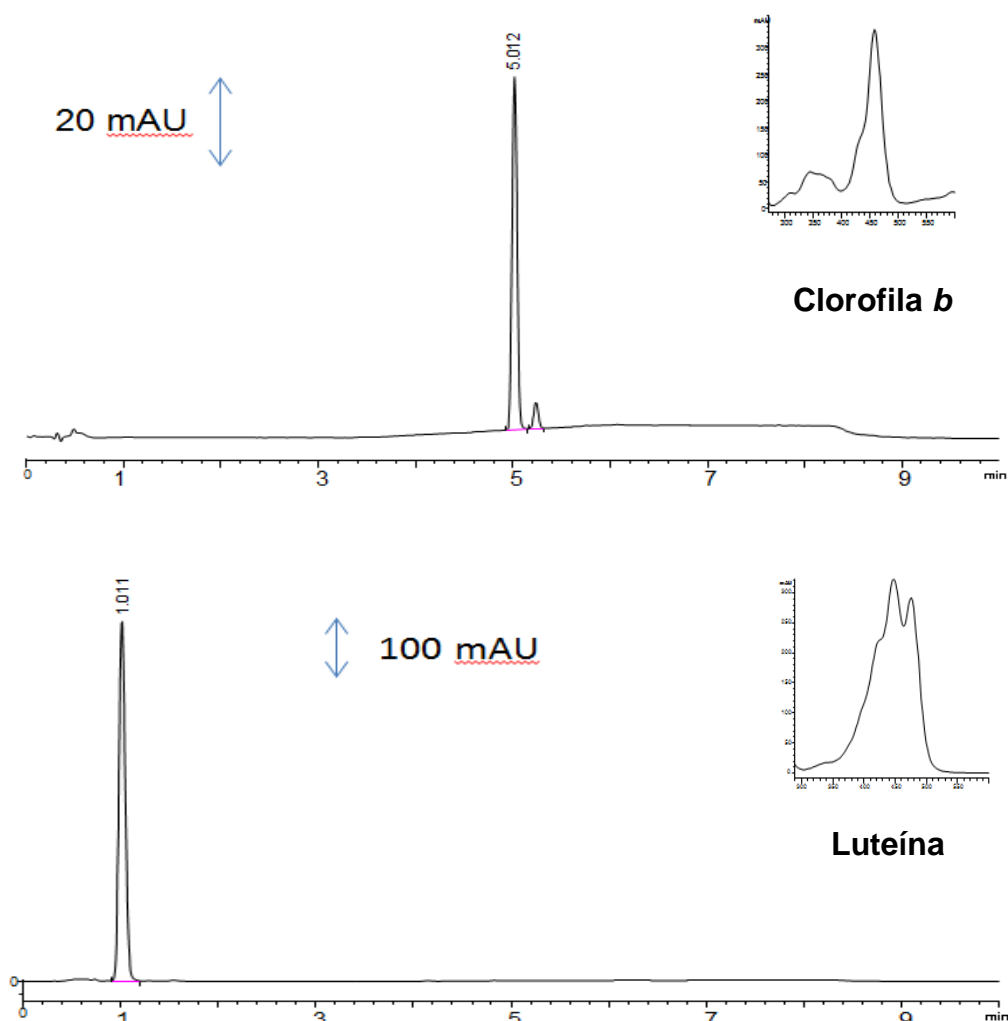
Após preparo das amostras, descrita no item 4.2, os pigmentos foram isolados em coluna cromatográfica aberta de sílica ativada e recolhidos manualmente. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, apresentando  $\beta$ -caroteno, clorofila *a* e clorofila *b* com purezas de 95%, 96% e 93%, respectivamente. A Luteína foi fornecida pela empresa Farma Service.

Os cromatogramas a seguir juntamente dos espectros de UV-Vis monitorados nos comprimentos de onda de absorção máxima referente a cada pigmento confirmam os analitos  $\beta$ -caroteno, clorofila *a* e clorofila *b*.

**Figura 10:** Cromatogramas dos pigmentos fotossintéticos isolados por cromatografia em coluna com o espectro de absorção de cada analito



**Figura 11:** Cromatogramas dos pigmentos fotossintéticos isolados por cromatografia em coluna com o espectro de absorção de cada analito



\*1000  $\mu\text{L}$  do eluato, seco em  $\text{N}_2(\text{g})$  e ressuspensionado em 300  $\mu\text{L}$  do diluente. Condições cromatográficas: fase estacionária, C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,8  $\mu\text{m}$ ), fase móvel em gradiente 100% solvente A (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ /Trietanolamina 90:9,9:0,1) 2,5 min; 50% solvente B (AcOEt), 2,5 min; solvente A/solvente B 50:50, 2,5 min, e retorna-se as condições iniciais do gradiente. Volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$  e fluxo de 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Fonte:** Autoria própria (2016)

### 5.1.1 Lei de Lambert-Beer

Segundo a lei de Lambert-Beer (Eq. 2, item 2.5) a absorvância é muito importante porque ela é diretamente proporcional à concentração,  $c$ , de espécies absorventes de luz na amostra. A grandeza  $\epsilon$  (épsilon) é chamada de absorvidade molar (ou coeficiente de extinção) e é a característica de uma substância que nos indica a quantidade de luz absorvida num determinado comprimento de onda.<sup>36</sup>

Sabendo-se o  $\epsilon$  específico de cada analito em determinados solventes (anexo) e com o auxílio de um espectrofotômetro UV-VIS pode-se obter as absorvâncias dos pigmentos isolados em seus comprimentos de onda de absorção máxima, obtendo a concentração para cada pigmento isolado,  $\beta$ -caroteno e clorofilas, e também para a luteína, utilizando a equação 2. Os parâmetros utilizados e resultados são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros utilizados e resultados obtidos por espectrofotometria

Pigmento	Solvente	$\epsilon$	$\lambda$ (nm)	$A_{\text{média}}$ n=3	b (cm)	C* ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
$\beta$ -caroteno	Hexano	2592 (100mL.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	453	0,0765	1	9,83
Luteína	Etanol	2550 (100mL.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	445	0,2451	1	32,0
Clorofila a	Acetona	88,15 (1000mL.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	663	0,6130	1	11,67
Clorofila b	Etanol 90%	51,36 (1000mL.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	647	0,5741	1	5,10

\*Calculado a partir da equação de lei de Lambert-Beer

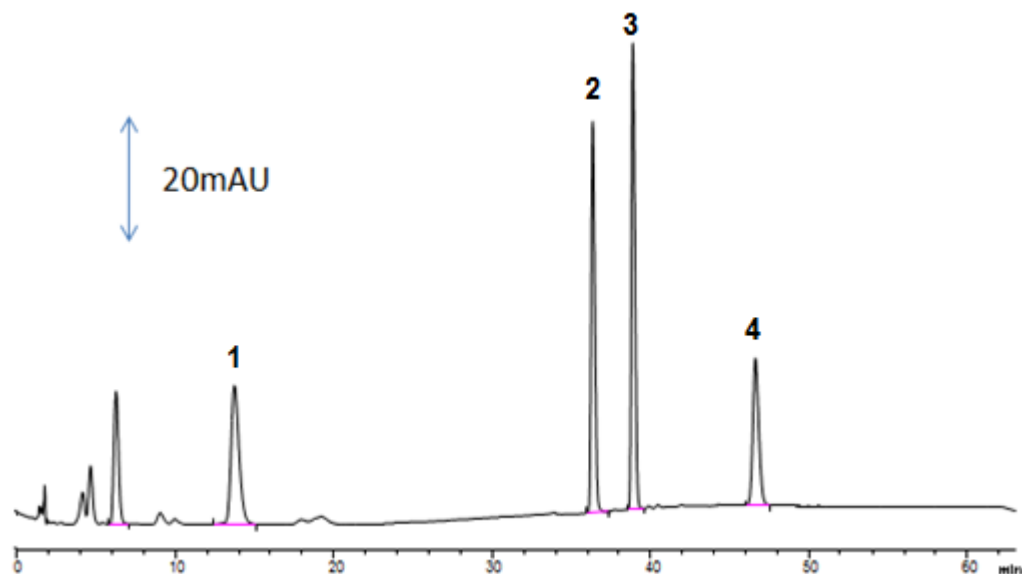
Com a concentração calculada a partir da lei de Lambert-Beer, pode-se corrigir a concentração na faixa linear utilizada para a construção da curva de calibração de cada padrão obtido.

## 5.2 Desenvolvimento do método por UPLC

### 5.2.1 Otimizações cromatográficas de HPLC para UPLC

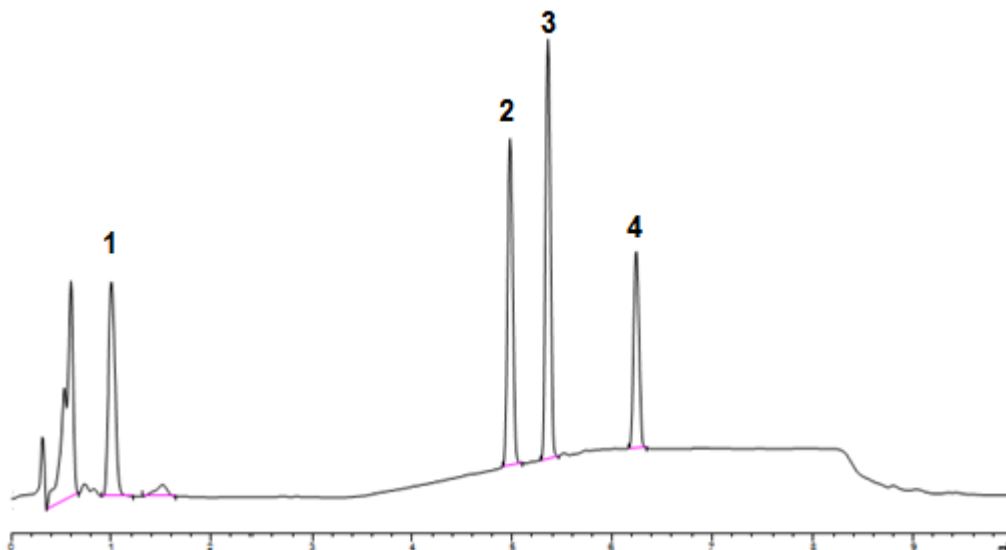
O método analítico proposto por CHU *et al.*<sup>43</sup> para separação cromatográfica dos carotenoides por HPLC-DAD realizada em fase reversa com uma coluna C18 Gemini- Phenomenex (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , segundo o cromatograma, apresentou tempo de análise total de 60 minutos.

**Figura 12:** Cromatograma obtido nas condições de CHU et. al. usando HPLC.



Identificação dos picos: luteína (1); clorofila *b* (2); clorofila *a* e  $\beta$ -caroteno

A análise do cromatograma acima mostra a eficiente separação dos carotenoides na metodologia adotada, mas observando o tempo de análise, algumas modificações nas condições cromatográficas foram realizadas, a fim de otimizar o tempo envolvido. Para isto, foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (ZORBAX RRHD Eclipse Plus) de menor comprimento e diâmetro, com tamanho da partícula de 1.8  $\mu\text{m}$ , com volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ . O fluxo foi mantido em 1 mL/min. Dessa forma, obteve-se uma condição cromatográfica de ultra eficiência (Figura 13), reduzindo em mais de 80% o tempo de análise, além da redução da quantidade significativa de fase móvel utilizada.

**Figura 13.** Cromatograma obtido após otimizações feitas em condições UPLC.

Identificação dos picos: luteína (1); clorofila *b* (2); clorofila *a* e  $\beta$ -caroteno

Foi alcançado um tempo de análise de 10 minutos, incluindo o condicionamento da coluna. Em comparação ao método de HPLC houve uma variação significativa na altura de pratos, como na quantidade de pratos por metro. A resolução entre os picos de clorofila *a* e *b* foram calculados, obtendo 1,90 para UPLC e 1,94 para HPLC, mostrando uma separação eficiente devido aos valores próximos, mesmo em menor tempo de análise, confirmando a eficiência de UPLC. Os parâmetros cromatográficos e de desempenho de separação do método foram avaliados e os resultados apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros cromatográficos e de desempenho do método desenvolvido por HPLC-DAD e UPLC-DAD.

	HPLC-DAD		UPLC-DAD	
	Altura (H) (mm)	N/m	Altura (H) (mm)	N/m
<b>Luteína</b>	0,3363	2973	0,3003	3330
<b>Clorofila a</b>	0,0159	62640	0,0055	180681
<b>Clorofila b</b>	0,0075	133190	0,0039	255618
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	0,0165	60425	0,0042	236295

### 5.2.2 Avaliação do desempenho do método (quantitativo)

Para a quantificação das amostras foi construída uma curva de calibração para cada padrão feito a partir das soluções estoque e analisadas nas condições cromatográficas de UPLC e monitoramento em 445 nm, na qual foram plotadas as áreas de seus respectivos picos vs sua concentração.

Para avaliar o desempenho do método desenvolvido para análises quantitativas, os parâmetros foram avaliados conforme descrito no item 4.5, e os resultados apresentados na tabela 3 e 4.

**Tabela 3.** Resultados obtidos das curvas de calibração dos carotenoides a partir do método cromatográfico aplicado.

Parâmetros	$\beta$ -caroteno	Luteína
Faixa linear	0,98 – 9,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3,20 – 32,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Equação da curva (n=3)	$y = 40,685x - 1,8112$	$y = 84,862x + 25,733$
Linearidade ( $R^2$ )	0,9999	0,9974
Slope $\pm$ desvio padrão	$41,359 \pm 0,133$	$85,059 \pm 2,170$
Intercepto $\pm$ desvio padrão	$-1,552 \pm 0,731$	$21,109 \pm 38,942$
LOD	0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$
LOQ	0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Tabela 4.** Resultados obtidos das curvas de calibração das clorofilas a partir do método cromatográfico aplicado.

Parâmetros	Clorofila a	Clorofila b
Faixa linear	1,17 – 11,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,51 – 5,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Equação da curva (n=3)	$y = 6,8052x + 3,0749$	$y = 14,303x + 3,7261$
Linearidade ( $R^2$ )	0,9988	0,9915
Slope $\pm$ desvio padrão	$6,807 \pm 0,134$	$14,304 \pm 0,764$
Intercepto $\pm$ desvio padrão	$3,066 \pm 0,876$	$3,722 \pm 2,183$
LOD	0,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$
LOQ	1,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$



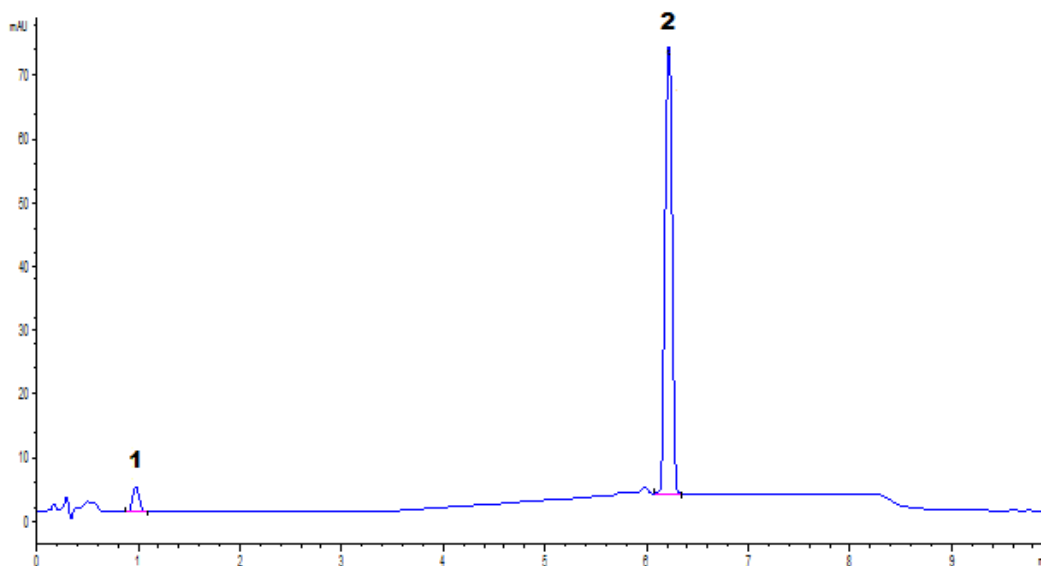
A partir das curvas de calibração obtidas, a linearidade do método para os pigmentos foram apresentadas pelos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), os quais demonstraram linearidade adequada na faixa de concentração estudada para todos os padrões.

### 5.2.3 Aplicação

O método desenvolvido foi aplicado em extratos de amostra de cenoura e espinafre. A quantificação foi realizada utilizando-se a curva de calibração externa. O preparo da amostra e as quantificações foram realizadas em triplicata.

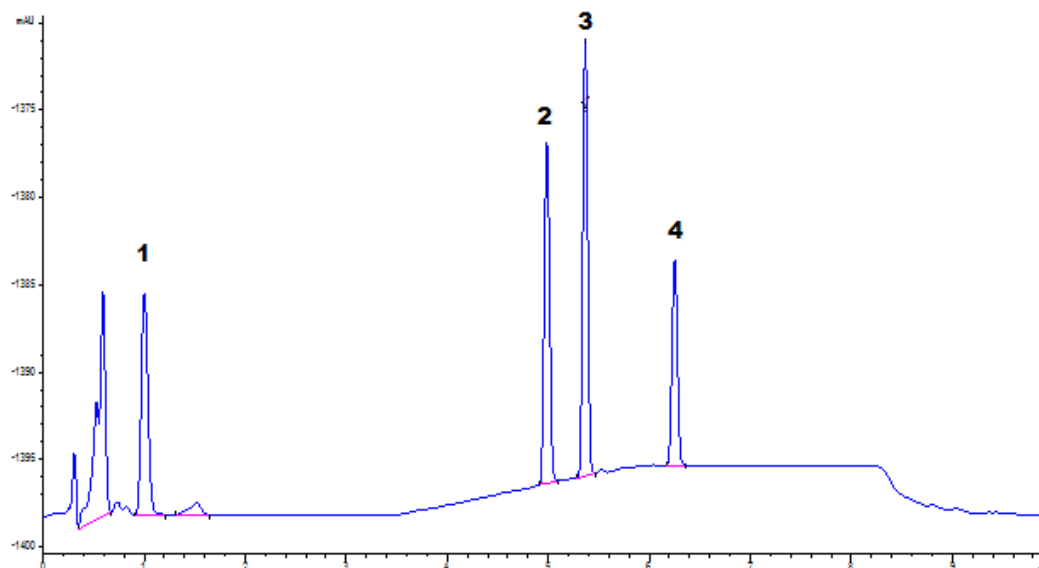
As clorofilas *a* e *b* e os carotenoides podem ser identificados pelos seus tempos de retenção e espectros de absorção, incluindo o comprimento de onda de máxima absorção quando comparados com os cromatogramas de seus padrões. Os cromatogramas das extrações de cenoura e espinafre estão demonstrado na figura 15 e 16 abaixo:

**Figura 14:** Cromatograma extrato de cenoura



Condições cromatográficas: fase estacionária, C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1.8  $\mu$ m), fase móvel em gradiente 100% solvente A (ACN/H<sub>2</sub>O/Trietanolamina 90:9,9:0,1) 2,5 min; 50% solvente B (AcOEt), 2,5 min; solvente A/solvente B 50:50, 2,5 min. Volume de injeção de 5  $\mu$ L e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Identificação dos picos: luteína (1) e  $\beta$ -caroteno (2).

**Fonte:** Autoria própria (2016)

**Figura 15:** Cromatograma extrato de espinafre

Condições cromatográficas: fase estacionária, C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1.8  $\mu$ m), fase móvel em gradiente 100% solvente A (ACN/H<sub>2</sub>O/Trietanolamina 90:9,9:0,1) 2,5 min; 50% solvente B (AcOEt), 2,5 min; solvente A/solvente B 50:50, 2,5 min. Volume de injeção de 5  $\mu$ L e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Identificação dos picos: luteína (1); clorofila *b* (2); clorofila *a* (3);  $\beta$ -caroteno (4).

**Fonte:** Autoria própria (2016)

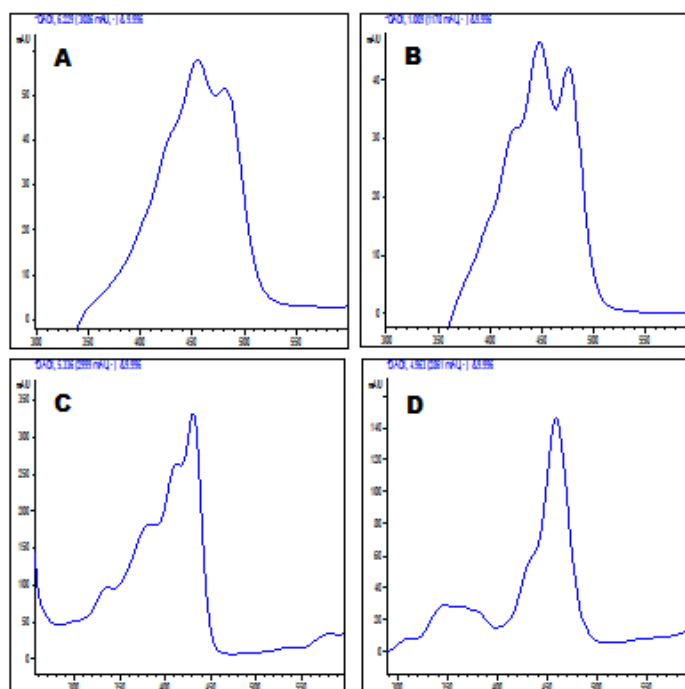
Após identificação dos picos correspondentes a cada pigmento, pode-se quantificar as amostras a partir das equações de reta obtidos da curva de calibração dos padrões de cada analito.

Para a amostra de cenoura a quantidade mensurada pelo método desenvolvido foi  $0,14 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  referente a luteína e de  $8,26 \pm 0,31 \mu\text{g mL}^{-1}$  referente ao  $\beta$ -caroteno, totalizando  $8,40 \pm 0,39 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais. Clorofilas não foram detectadas, como já era de se esperar devido a coloração. Para a amostra de espinafre a quantidade encontrada foi de  $6,65 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  referente a luteína,  $5,58 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o  $\beta$ -caroteno, totalizando  $12,23 \pm 0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais. Para a luteína foi considerada a área dos picos próximos ao seu pico correspondente devido a provável coeluição, que foi observado através dos espectros de absorção detectado, serem iguais à luteína, considerando como carotenoides totais. Para a clorofilas *a* e *b* as quantidades encontradas foram de  $58,88 \pm 0,76 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $23,27 \pm 0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

#### 5.2.4 Determinação dos pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis

A presença de grupos cromóforos nos analitos estudados, como a molécula de porfirina nas clorofilas e as longas cadeias de hidrocarbonetos insaturados formando a classe dos terpenos nos carotenoides, apresentam absorção na região do UV-Vis, o que permitiu a utilização deste tipo de detector (disponível no laboratório) nas análises. A utilização do detector de arranjo de diodos do HPLC permitiu a confirmação dos analitos pela obtenção dos respectivos espectros (Figura 16) comparadas à literatura (anexo).

**Figura 16.** Espectros com banda de absorção na região UV-Vis dos pigmentos fotossintéticos.



\*Identificação das bandas de absorção:  $\beta$ -caroteno (A), Luteína (B), clorofila *a* (C) e clorofila *b* (D).

**Fonte:** Autoria própria (2016)

O detector utilizado nas análises por HPLC apresentou problemas quanto a faixa de comprimento de onda. Por este tipo de detector conter lâmpadas de deutério e tungstênio esperasse que abrangesse toda a região do UV-Vis, na faixa de intervalo de 190 – 800 nm, mas o detector só alcançou 640 nm, sendo assim os

espectros de carotenoides puderam ser obtidos por completo, mas as clorofilas *a* e *b* como possuem dois máximos de absorção, sendo um deles em 662,1 e 645,5 nm (em acetona) respectivamente, não puderam ser observadas, apenas o máximo de absorção na região dos 400 nm destes analitos, obtendo um espectro incompleto, mas que já pode ser utilizado por ser bem característico.

## 5.2 Desenvolvimento do método por espectrofotometria

Para aplicação do método espectrofotométrico na determinação e quantificação das amostras de pigmentos fotossintéticos, existem várias equações em diferentes solventes, citados por diversas referências<sup>46,47</sup>.

Estas equações são baseadas na redeterminação dos coeficientes de absorção em diversos solventes para a determinação simultânea das clorofilas, relacionando as clorofilas *a* e *b*, como também dos carotenoides nos extratos de pigmentos.

Segundo equações publicadas por Lichtenthaler e Buschmann<sup>48</sup>, a absorvância dos extratos de cenoura e espinafre foram medidos nos comprimentos de onda de 470,0; 644,8; 661,6; 750,0 nm em acetona com um ensaio em branco. A equação utilizada para a determinação dos pigmentos utilizando acetona p.a como solvente é demonstrada abaixo:

$$\begin{aligned} C_a &= 11,24 A_{661.6} - 2,04 A_{644.8} \\ C_b &= 20,13 A_{644.8} - 4,19 A_{661.6} \\ C_{(x+c)} &= (1000 A_{470} - 1,90C_a - 63,14C_b) / 214 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde  $C_a$  é a clorofila *a*,  $C_b$  é a clorofila *b* e  $C_{(x+c)}$  são os carotenoides totais, todas expressas em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e sendo *A* referente a absorvância obtida nos comprimentos de onda específico no solvente utilizado.

Para a amostra de cenoura foi obtido uma absorvância média de 0,2884 em  $\lambda=470$  nm, e sem valores significantes de absorvância para  $\lambda= 644,8$  e  $\lambda= 661,6$ ; como já esperava-se pois a coloração laranja da cenoura indica a ausência de clorofilas e presença de carotenoides. Para a amostra de espinafre, a absorvância média obtida nos comprimentos de onda de 470,0; 644,8 e 661,6 foram 0,8422;

0,3873 e 1,0216 respectivamente. Portanto, foi encontrado na cenoura uma quantidade mensurável de  $6,74 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais, e para a amostra de espinafre  $53,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  de clorofila *a*,  $17,58 \mu\text{g mL}^{-1}$  de clorofila *b* e  $14,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides totais.

### 5.3 Comparação dos resultados obtidos por cada metodologia empregada

Estudadas e aplicadas duas técnicas de determinação e quantificação para pigmentos fotossintéticos, pôde-se avalia-las a fim de se obter a melhor resposta. Assim, para avaliação da exatidão do método os dados obtidos por UPLC foram comparados com os dados obtidos por espectrofotometria. Analisando os dados da Tabela 5 podemos concluir que o método desenvolvido apresenta uma boa exatidão quando comparado com os dados obtidos por espectrofotometria aliada a Equação 5.

**Tabela 5:** Comparação da concentração encontra entre as técnicas nas amostras

<b>Amostra</b>	<b>Carotenoides totais</b>	<b>Clorofila <i>a</i></b>	<b>Clorofila <i>b</i></b>
<b>Espinafre (UPLC)</b>	$12,23 \mu\text{g mL}^{-1}$	$58,88 \mu\text{g mL}^{-1}$	$23,27 \mu\text{g mL}^{-1}$
<b>Espinafre (Espectrofotometria)</b>	$14,01 \mu\text{g mL}^{-1}$	$53,46 \mu\text{g mL}^{-1}$	$17,58 \mu\text{g mL}^{-1}$
<b>Cenoura (UPLC)</b>	$8,40 \mu\text{g mL}^{-1}$	-	-
<b>Cenoura (Espectrofotometria)</b>	$6,74 \mu\text{g mL}^{-1}$	-	-

Para a amostra de espinafre, os valores obtidos para a concentração das clorofilas foi observada uma diferença maior nos resultados entre essas, quando em comparação aos carotenoides totais, para ambas as técnicas. Possivelmente deve-se à fotossinsibilidade das clorofilas *a* e *b*, por isso a rápida degradação mesmo com a análise sendo realizada no mesmo dia.

Realizando um teste *t* pareado para avaliação das diferenças obtidas entre as concentrações, foi observado que a diferença não foi significativa, obtendo um valor aceito entre todas as concentrações, sendo o valor de *t* calculado menor que o *t* crítico.

A partir dos resultados obtidos e as metodologias empregada para análise dos pigmentos fotossintéticos, foi observado que a técnica de cromatografia líquida possui resultados mais exatos e precisos que a espectrofotometria, porém de alto custo. Mas UPLC se torna melhor que HPLC devido a significativa redução de tempo e gasto de solvente. A técnica de espectrofotometria UV-Vis é menos seletiva que UPLC, quando há necessidade de uma especiação, porém possui um custo de aquisição e operação muito menor, sendo assim mais acessível.

## 6. CONCLUSÃO

Comparando as duas técnicas estudadas neste trabalho, cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrofotometria, foram obtidos valores muito próximos de concentração de clorofila e carotenoides, mostrando que ambas as técnicas podem ser utilizadas de forma eficiente para a quantificação destes analitos.

Para aplicação em agricultura, onde o intuito é quantificar as clorofilas *a* e *b* e carotenoides totais, a técnica de espectrofotometria se mostrou bastante satisfatória, baseado nos valores obtidos, visando uma análise rápida e baixo custo. Entretanto, em uma análise onde a especiação seja necessária, como a quantificação de cada pigmento dos carotenoides, este método não é adequado, sendo mais interessante assim, o método desenvolvido para técnica de UPLC, onde é possível fazer a especiação dos carotenoides, que também se mostrou eficiente, com boa resolução, menor quantidade de fase móvel e maior velocidade em relação a HPLC.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CURTIS, H.; Como as plantas capturam energia do sol. **Biologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.122-137, 1977.
2. SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W.; **Fisiologia das plantas**, 4.ed., Cengage Learning, 2012.
3. SEIFERMAN-HARMS, D.; The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiology Plantarum**; 69, 561-568, 1987.
4. ESTUDO PRÁTICO. Disponível em: <http://www.estudopratico.com.br/fotossintese-das-plantas-entenda-esse-processo-e-suas-fases/>. Acesso em maio de 2016.
5. TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**, 4.ed., p693, 2009.
6. PURVES, W. K. et al. Fotossíntese: energia do sol. **Vida: a ciência da biologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p.136-153, 2002.
7. LAMBERS, H., SHANE, M.W.; Role of root clusters in phosphorus acquisition and increasing biological diversity in agriculture. **Research: Gene-Plant-Crop Relations**. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p237–250, 2007.
8. IKE, A., TODA, N., TSUJI, N., HIRATA, K., MIYAMOTO, K.; Hydrogen photoproduction from CO<sub>2</sub>-fixing microalgal biomass: application of halotolerant photosynthetic bacteria. **J. Ferment. Bioeng.** 84, 606–609, 1997.
9. HALL, D.O., RAO, K.K.; **Coleção Temas de Biologia: Fotossíntese**. Editora Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo, p.89, 1980.
10. ROMANO, M.R. Análise de crescimento, produção de biomassa, fotossíntese, e biossíntese de aminoácidos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expressam o gene *Lhcb1\*2* de ervilha. **Dissertação -Mestrado em Ciências**, área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de plantas) 66f. - Esalq / USP, 2001.
11. KLUGE, R.A. **Fisiologia vegetal: apontamentos de aulas teóricas de fotossíntese**. LCB - 311, ESALQ/USP.



12. HALLIDAY, D., 1916; RESNIK, R.; **Fundamentos de Física**, 8ª Edição, v.4: óptica e física moderna; Tradução e revisão técnica: Ronaldo Sérgio de Biasi, Rio de Janeiro, 2009.
13. SKOOG, A.D.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo: Editora Thomson, p104, 2006.
14. SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, 361-371, 2002.
15. WELBURN, A.R.; The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144, 307-313, 1994.
16. CODOGNOTTO, L. M. et al. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. **Revista Ecosystema**, v. 27, n. 12, 2002.
17. BOO, H. O., HWANG, S. J., BAE, C. S., PARK, S. H., HEO, B. G., & GORINSTEIN, S.; Extraction and characterization of some natural plant pigments. **Industrial Crops and Products**, 2012.
18. BRITTON, G., UV/visible spectroscopy. In: BRITTON, G. et al. **Carotenoids, spectroscopy**. Birkhauser, v.1, 13-62, 1995.
19. REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do Jequitibá-rosa. Boletim de Pesquisa Florestal, **Embrapa Florestas**, n. 53, p.179-194, 2006.
20. BARROSO, G.F. BMLP - **Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura. Programa de Monitoramento Ambiental. Protocolo para Análise de clorofila a e feopigmentos pelo método fluorímetro TD-700**. Vitória, Espírito Santo, p.1-21, 1998.
21. TUCKER, C. J. Asymptotic nature of grass canopy spectral reflectance. **Applied Optics**, v. 16, p. 1151–1156, 1977.

22. MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, p201, 1997.
23. SOFIATTI, V. et al.; **Determinação da concentração de pigmentos da fotossíntese em folhas de algodoeiro por meio do clorofilômetro portátil clorofilog-10301**. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 7., Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 852-858, 2009.
24. VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin – Madison, 10, 782-799, 2000.
25. STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H.; As clorofilas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.748-755, 2005.
26. MUSSI, L. Eficiência fotodinâmica das protoporfirinas IX de magnésio e zinco. **Dissertação (Mestrado em Química)** - Curso de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Unicamp, 73p. ,2003.
27. LICHTENTHALER, H. K.; Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.** 148, 350–382, 1987.
28. MA, L.; DOLPHIN, D.; **Phytochemistry**, 50, 195; 1999.
29. AZIZULLAH, A.; REHMAN, Z.U.; ALI, I; MURAD, W; MUHAMMAD, N; ULLAH, W; HÄDER, DP. Chlorophyll derivatives can be an efficient weapon in the fight against dengue. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **Parasitol Res.**, 13, 4321-6, 2014.
30. RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G.; **Química de Alimentos**. 1ªedição, Instituto Mauá de Tecnologia, Editora: Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 155-157, 2004.
31. GOODWIN, T.W., **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. London; New York: Academic Press, 1965.
32. VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. e JÚNIOR, A.F.; Produção de carotenoides:

microorganismos como fonte de pigmentos naturais, **Química Nova**, Vol. 32, No. 9, 2429-2436, 2009.

33. SILVA, M.L.C; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S; KOBLITZ, M.G.B; Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais . **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, 669-682, 2010.

34. NIIZU, P.Y.; **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.

35. SKOOG, A.D., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo: Editora Thomson, 2006. 1104 p.

36. HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Tradução da 7ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, p867, 2008.

37. RAIMUNDO, I.M.; PASQUINI, C.; Espectrofotometria Multicanal e Arranjos de Fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, 83-88, 1997.

38. LANÇAS, F.M.; **Cromatografia líquida moderna (HPLC/CLAE)**. Editora Átomo, Campinas, p382, 2009.

39. RIVERA, S.M.; CANELA-GARAYOA, R.; Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, 1224, p1-10, 2012.

40. BRUICE, P.Y. **Organic chemistry**. 4th ed. California: Prentice Hall, p1228, 2004.

41. LOBINSKI, R.; MARCZENKO, Z.; Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Crit. Rev. Analytical Chemistry**. 23, 55, 1992.

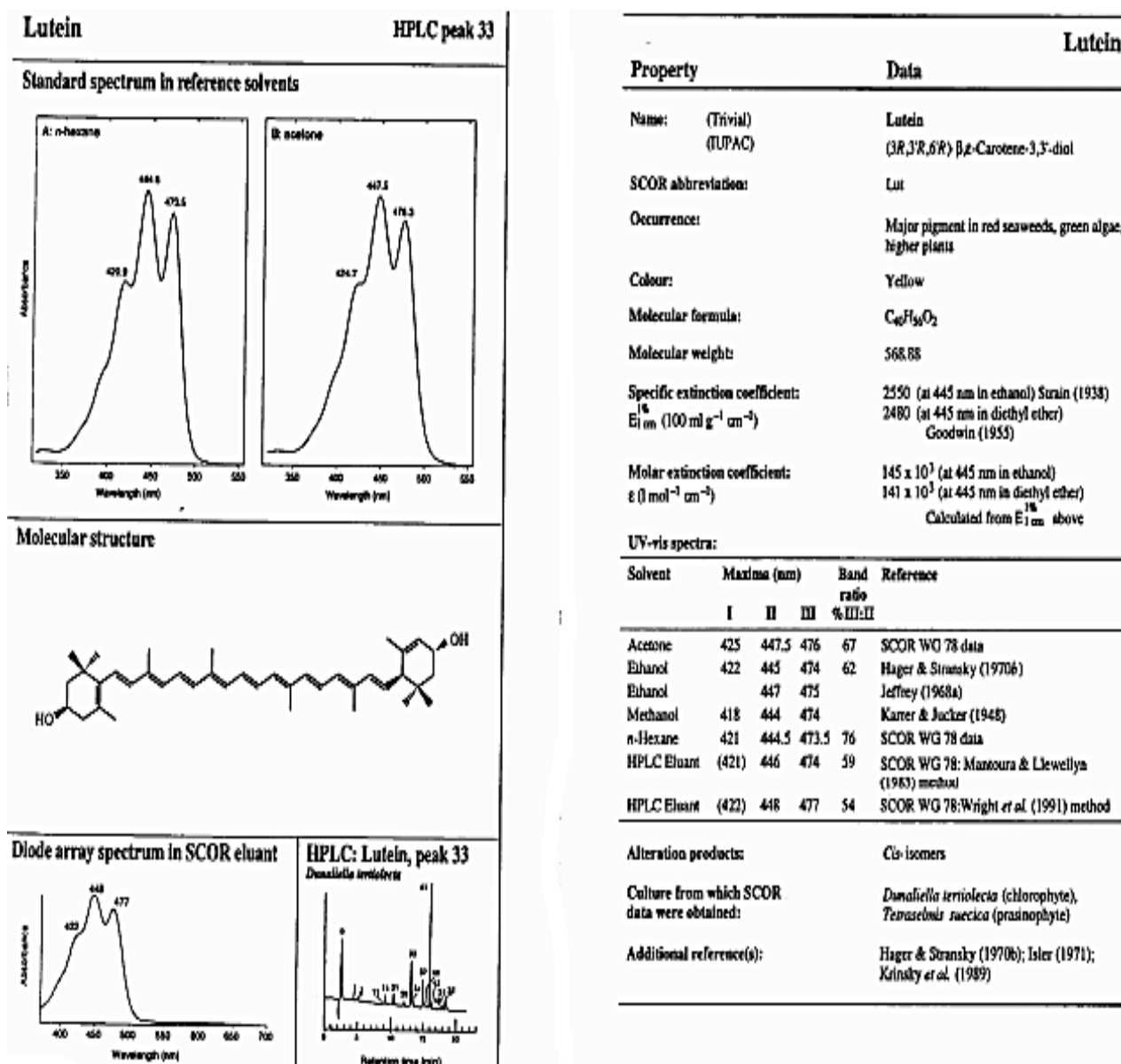
42. PACHECO, S.; GODOY, R.L.O; PEIXOTO, F.M.; GOUVÊA, A.C.M.S; SANTIAGO, M.C.P.A.; FELBERG, I.; BORGUINI, R.G.; Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale. **Analytical Chemistry na Indian Journal**. Acaij, 12, 194-197, 2013.

43. CHU, D.; XIE, Y.; HONG, S.; YAN, X.; TONG, H.; LIU, S.; Major Carotenoids in Tobacco Laminas: Identification and Quantification by HPLC with Photodiode Array Detection. **Asian Journal of Chemistry**, p.2635-2647, 2010.

44. RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. vol.27, n.5, 771-780, 2004.
45. Paschoal JAR, Rath S, Airolti FPS & Reyes FGR. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, 31, 1190-1198, 2008.
46. SZESTAK, Z. Plant photosynthetic production: manual of methods. Dr. W. Junk Publ, The Hague, p672. 1971
47. HOLDEN, M.; **Chemistry and biochemistry of plants pigments**. 2.ed., Vol 2, p.1, Academic Press, New York, 1976.
48. LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), **Current protocols in food analytical chemistry** (pp. F4.3.1-F4.3.8). New York, NY, USA, 2001.

## 8 ANEXOS

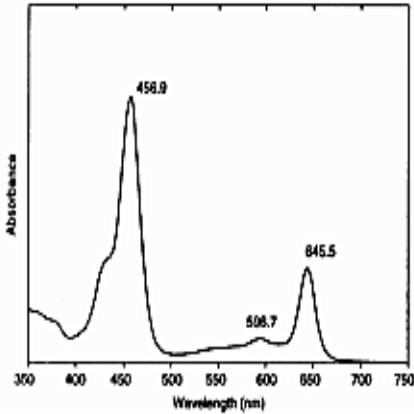
## Anexo 1 – Propriedades da molécula de luteína



Fonte: ALFRED-WEGENER-INSTITUT (AWI). Disponível em:

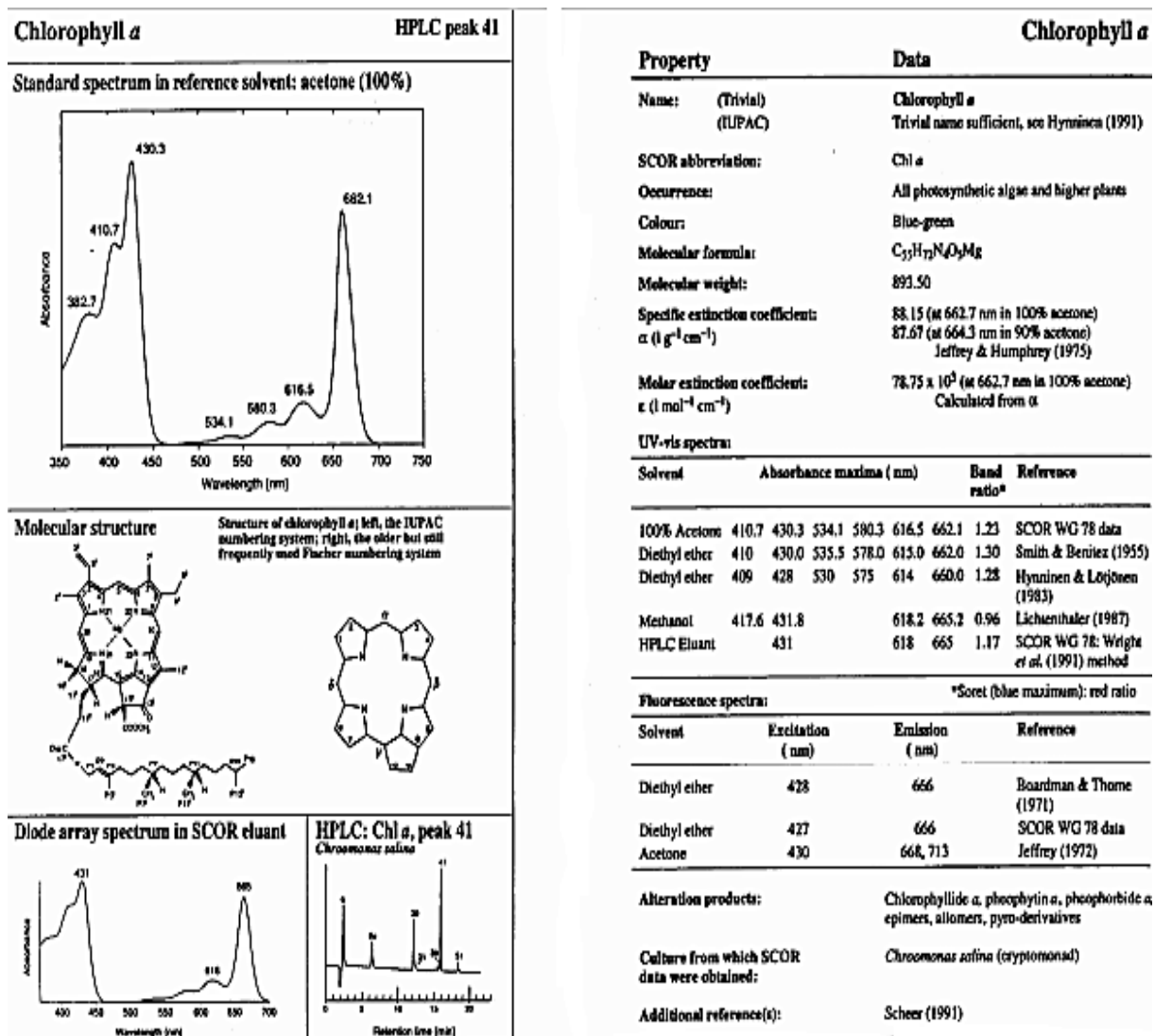
<https://epic.awi.de/28847/1/Jef1997ac.pdf>. Acesso em junho de 2016.

## Anexo 2 - Propriedades da molécula de clorofila *b*.

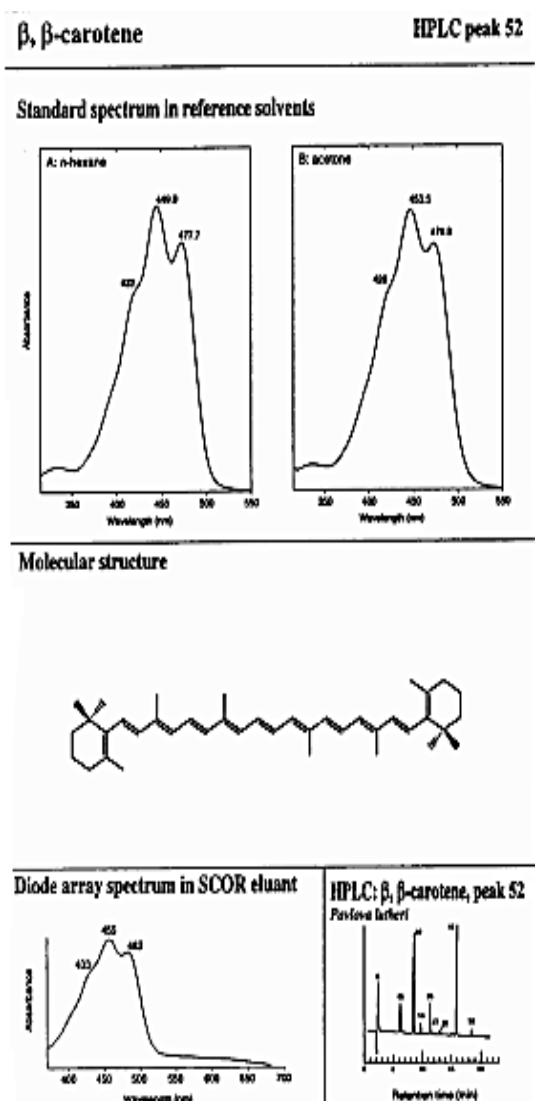
Chlorophyll <i>b</i>		HPLC peak 37		Chlorophyll <i>b</i>	
Standard spectrum in reference solvent: acetone (100%)				Property	
				Data	
				Names:	(Trivial) Chlorophyll <i>b</i> (IUPAC) Trivial name sufficient, see Hynninen (1991)
				SCOR abbreviation:	Chl <i>b</i>
				Occurrence:	Higher plants, green algae, symbiotic prochlorophytes
				Colour:	Olive green (TLC); emerald green (concentrated solution)
				Molecular formula:	C <sub>55</sub> H <sub>70</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> Mg
				Molecular weight:	907.49
				Specific extinction coefficient:	51.36 (at 646.8 nm in 90% acetone) 62.00 (at 643.3 nm in diethyl ether) Jeffrey & Humphrey (1975)
				Molar extinction coefficient:	46.61 x 10 <sup>3</sup> (at 646.8 nm in 90% acetone) 56.26 x 10 <sup>3</sup> (at 643.3 nm in diethyl ether) Calculated from $\alpha$ above
				UV-vis spectra:	
				Solvent	Absorbance maxima (nm)
				100% Acetone	456.9 596.7 645.5
				Diethyl ether	455 595 644
				Diethyl ether	453 593 642
				Ethanol	464 649
				HPLC Eluant	458 596 646
					Band ratio*
				100% Acetone	2.82 SCOR WG 78 data
				Diethyl ether	2.81 Smith & Benitez (1955)
				Diethyl ether	2.77 Hymäläinen & Löfgren (1983)
				Ethanol	Griffiths (1991)
				HPLC Eluant	2.83 SCOR WG 78; Wright <i>et al.</i> (1991) method
				Fluorescence spectra:	*Soret (blue maximum); red ratio
				Solvent	Excitation (nm)
				Diethyl ether	453
				100% Acetone	459
				100% Acetone	453
					Emission (nm)
				Diethyl ether	646
				100% Acetone	652, 710
				100% Acetone	652
					Reference
				Diethyl ether	Boardman & Thorne (1971)
				100% Acetone	Jeffrey (1972)
				100% Acetone	SCOR WG 78 data
				Alteration products:	Chlorophyllide <i>b</i> , pheophytin <i>b</i> , pheophorbide <i>b</i> , epimers, allomers, pyro-pheophytin <i>b</i>
				Culture from which SCOR data were obtained:	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (chlorophyte), <i>Micromonas pusilla</i> (prasinophyte)
				Additional reference(s):	Scheer (1991)

Fonte: ALFRED-WEGENER-INSTITUT (AWI). Disponível em: <https://epic.awi.de/28829/1/Jef1997k.pdf>. Acesso em junho de 2016.

## Anexo 3 - Propriedades da molécula de clorofila a.



Fonte: ALFRED-WEGENER-INSTITUT (AWI). Disponível em: <https://epic.awi.de/28828/1/Jef1997j.pdf>. Acesso em junho de 2016.

Anexo 4 – Propriedades da molécula de  $\beta$ -caroteno.

Property	Data		
Name:	(Trivial) $\beta$ -Carotene (IUPAC) $\beta,\beta$ -Carotene		
SCOR abbreviation:	$\beta\beta$ -car		
Occurrence:	Major pigment in higher plants, green algae; minor or trace pigment in chromophyte algae		
Colour:	Yellow-orange		
Molecular formula:	$C_{40}H_{56}$		
Molecular weight:	536.88		
Specific extinction coefficient:	2500 (at 454 nm in acetone) Hiyama <i>et al.</i> (1969)		
$E_{1\%}^{1cm}$ (100 ml g <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	2592 (at 453 nm in hexane) Isler <i>et al.</i> (1956) 2620 (at 453 nm in ethanol) Isler <i>et al.</i> (1956)		
Molar extinction coefficient:	$134 \times 10^3$ (at 454 nm in acetone) $139 \times 10^3$ (at 453 nm in hexane) $141 \times 10^3$ (at 453 nm in ethanol) Calculated from $E_{1\%}^{1cm}$ above		
UV-vis spectra:			
Solvent	Maxima (nm)	Band ratio	Reference
	I II III	%III:II	
Acetone	(426) 453.5	479.9	21 SCOR WG 78 data
Hexane	(422) 449.9	477.7	36 SCOR WG 78 data
Ethanol	(427) 449	475	Katayama <i>et al.</i> (1972)
HPLC Eluant	(425) 453	476	22 SCOR WG 78; Mantoura & Llewellyn (1983) method
HPLC Eluant	(433) 455	482	22 SCOR WG 78; Wright <i>et al.</i> (1991) method
Alteration products:	Cis-isomers		
Culture from which SCOR data were obtained:	<i>Pavlova lutheri</i> (prymnesiophyte)		
Additional reference(s):	Goodwin (1980)		

**Fonte:** ALFRED-WEGENER-INSTITUT (AWI). Disponível em: <https://epic.awi.de/28824/1/Jef1997f.pdf>. Acesso em junho de 2016.